

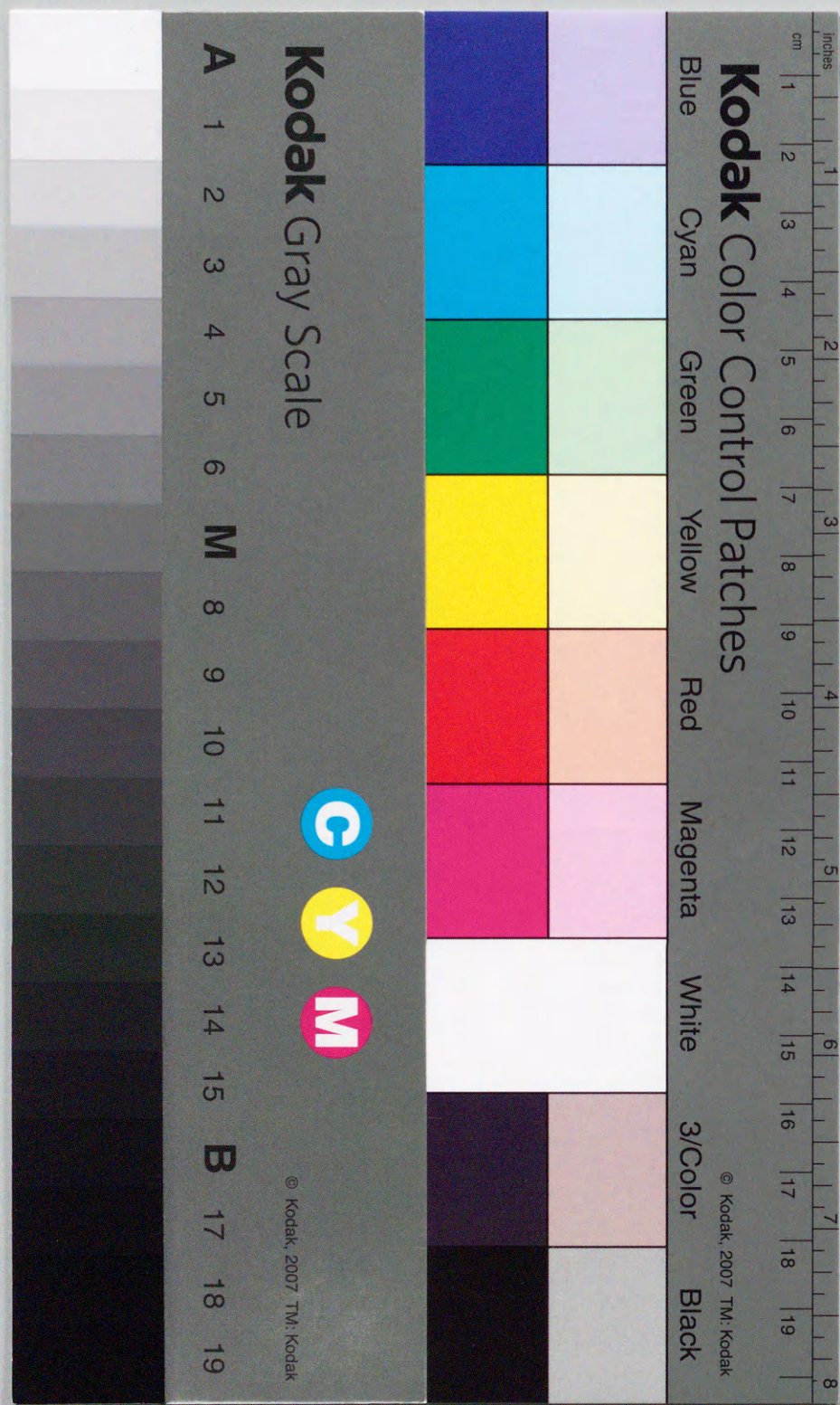
新規ジヒドロピリジン系カルシウムチャネル拮抗薬 プラニジピンの薬理学的特性の検討

著者	平野 隆弘
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54318

新規ジヒドロピリジン系カルシウム
チャンネル拮抗薬プラニジピンの
薬理学的特性の検討

2000年

平野 隆弘



新規ジヒドロピリジン系カルシウム
チャンネル拮抗薬プラニジピンの薬理
学的特性の検討

平野 隆弘

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

- 1) Hirano T., Mori T., Kido M., Toide K., Ohura M., Fujiki H., Orito K., Yoshida K., Ikezono K., Sumida T., Nakayama N., Yabuuchi Y., Differential properties of the optical-isomers of pranidipine, a 1,4-dihydropyridine calcium channel modulator, *Fundam. Clin. Pharmacol.* (1999, in press)
- 2) Mori T., Takeuchi T., Ohura M., Miyakoda G., Fujiki H., Orito K., Yoshida K., Hirano T., Yamamura Y., Sumida T., Nakaya Y., Satake H., Hata F., Pranidipine, a new 1,4-dihydropyridine calcium channel blocker, enhances cyclic GMP-independent nitric oxide-induced relaxation of the rat aorta, *Mol. Cell. Biochem.* 178 (1998) 335-343.
- 3) Hirano T., Ohura M., Orito K., Fujiki H., Miyakoda G., Mori T., Venodilator effects of pranidipine, a 1,4-dihydropyridine Ca^{2+} channel antagonist, in rats: comparison with nifedipine and amlodipine, *Eur. J. Pharmacol.* 324 (1997) 201-204.

目次

略語表	4
緒言	5
第 1 章 プラニジピンの光学異性体による薬理学的差異の検討	7
第 1 節 ラット摘出大動脈リング標本におけるカルシウム収縮に対する光学異性体の抑制効果	8
第 2 節 自然発症高血圧ラット (SHR) に対する降圧作用	12
第 3 節 プラニジピンの安定構造の計算	15
第 4 節 考察	16
第 2 章 プラニジピンによる cGMP 非依存性 NO 血管弛緩反応の増強作用	19
第 1 節 摘出大動脈リング標本における内皮依存性弛緩反応の延長作用	20
第 2 節 内皮由来構成型 NO 合成酵素 (cNOS) 活性に対する作用	25
第 3 節 摘出大動脈リング標本における cGMP 含量に対する作用	26
第 4 節 血管平滑筋スキンドファイバー標本における収縮タンパクのカルシウム感受性および cGMP に対する直接作用	28
第 5 節 摘出大動脈リング標本のメチレンブルー処置下における内皮依存性弛緩反応増強作用	30
第 6 節 内皮除去摘出大動脈リング標本におけるニトログリセリン誘発内皮依存性弛緩反応の延長作用	32
第 7 節 考察	38
第 3 章 麻酔下ラットにおけるプラニジピンの静脈拡張作用	43
第 1 節 ラットにおける平均循環充満圧に対する作用	44

第 2 節 考察	50
第 4 章 総括	53
付記	56
薬物	56
薬物調製	57
データ解析	58
謝辞	59
引用文献	60

略語表

1,4-DHP	1,4-dihydropyridine	1,4-ジヒドロピリジン
L-VDCC	L-type voltage-dependent calcium channels	L-タイプ電位依存性カルシウムチャネル
K-H 液	Krebs-Henseleit solution	Krebs-Henseleit 栄養液
SHR	spontaneously hypertensive rat	自然発症高血圧ラット
NO	nitric oxide	一酸化窒素
cGMP	cyclic guanosine 3',5'-monophosphate	サイクリック GMP
DMSO	dimethylsulfoxide	ジメチルスルフォキシド
DMF	dimethylformamide	ジメチルフォルムアミド
Ach	acetylcholine	アセチルコリン
PGF _{2α}	prostaglandin F _{2α}	プロスタグランジン F _{2α}
LNNA	N ^G -nitro-L-arginine	N ^G -ニトロ-L-アルギニン
cNOS	constitutive nitric oxide synthase	構成型一酸化窒素合成酵素
ecNOS	endothelial constitutive nitric oxide synthase	内皮由来構成型一酸化窒素合成酵素
GTN	glyceryl trinitrate	ニトログリセリン
MB	methylene blue	メチレンブルー
MCFP	mean circulatory filling pressure	平均循環充満圧
VPP	venous plateau pressure	p45 参照
FAP	final arterial pressure	p45 参照
CVP	central venous pressure	中心静脈圧
MAP	mean arterial pressure	平均動脈圧

緒言

カルシウム拮抗薬は、化学構造の差異により、主に 1,4-ジヒドロピリジン系 (1,4-DHP)、ベンゾチアゼピン系およびフェニルアルキルアミン系に大別される。これらカルシウム拮抗薬は、すべて電位依存性 L 型カルシウムチャネル阻害作用を有するが、1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬は、その他 2 種の拮抗薬と比較し心抑制作用が弱く、血管選択性が高い。これは、薬物の結合部位の違い (Hering *et al.*, 1998; Hockerman *et al.*, 1997; Striessnig *et al.*, 1998) や L 型カルシウムチャネル分子そのものの組織での違いに起因すると考えられているが、実態は十分に解明されていない。1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬は、安定した降圧作用を示し、副作用や禁忌が少ないことから、高血圧および狭心症治療薬として頻用されてきた。しかし近年、虚血性心疾患患者などにおける急激かつ過度な降圧は、むしろ心血管事故発生率の増加 (Psaty *et al.*, 1995)、生存率の悪化 (Cruickshank *et al.*, 1987; Furberg *et al.*, 1995) や、副作用発現率の増加 (Pahor *et al.*, 1996) を引き起こすことが報告され、短時間作用型の 1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬の安全性に疑問が持たれている。一方、長時間作用型の 1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬に関しては、長期大規模介入調査試験において、アムロジピンによる非虚血性心不全の予後改善効果 (PRAISE Study) (Packer *et al.*, 1996)、およびニトレンジピンによる心事故発生率の低下 (SYST-EUR Study) (Staessen *et al.*, 1997) など、心合併症をむしろ減少させる成績が相次いで報告されていることから、今後さらに心不全などへの適応症が期待され、医療に貢献していくものと考えられる。

プラニジピンは、アムロジピンやニトレンジピンと同様の長時間作用型の 1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬である。1,4-DHP 誘導体は、光学異性体を有する化合物が多く、作用力価が両異性体で異なる化合物の他、幾つかの化合物においては 2 種の異性体がカルシウムチャネルの拮抗薬と作動薬という相反する作用を示す (Goldmann & Stoltefuss, 1991)。プラニジピンも同様に光学異性体を有するため、本研究の第 1 章では、異性体間の薬理学的差異を、ラット摘出大動脈標本および麻酔下自然発症高血圧ラット (SHR) を用い検討した。さらに、これら異性体のコンピュータによる安定構造計算予測を行い、従来から提唱されている 1,4-DHP の構造活性相関との類似性について考察を加えた。プラニジピンは、すでに臨床試験および動物モデルにおいて、高血圧ならびに狭心症治療薬としての有効性が証明されている (Broadhurst *et al.*, 1991; Miyakoda *et al.*, 1995; Mori *et al.*, 1993; Nakayama *et al.*, 1990; 1991; 1993; Nishinaka *et al.*, 1994; Rosenthal *et al.*, 1996; Tominaga *et al.*, 1995)。さらにプラニジピンは、既存のカルシウム拮抗薬と異なり、ラット摘出大動脈標本において、内皮依存性弛緩反応を延長する作用を有することが見出されている (Nakayama *et al.*, 1993)。しかし、その作用メカニズムおよび生体への影響については解明されていなかった。そこで第 2 章では、その作用メカニズムを様々な *in vitro* の実験系で解析し、第 3 章でその作用に基づく静脈系への影響について麻酔下ラットを用い検討した。

第1章 プラニジピンの光学異性体による薬理学的 差異の検討

1,4-ジヒドロピリジン (1,4-DHP) 誘導体は、L-タイプ電位依存性カルシウムチャネル (L-VDCC) に作用するが、光学異性体を有する化合物が多い。これら光学異性体の作用には、構造活性相関が確立されつつあり、1,4-DHP は、4 位のアリル基が equatorial よりも axial の方が、より安定しており、L-VDCC に対する作用が明確に現れることが知られている (Goldmann & Stoltefuss, 1991)。また、1,4-DHP の薬理学的作用には 3 位と 5 位のエステル基の関係が重要であり、これらが非対称型に配置する方が活性が強くなることが報告されている (Goldmann & Stoltefuss, 1991)。また、興味ある結果として、1,4-DHP の中でも Bay K 8644, PN 202-791 および H 160/51 などは、L-VDCC に対し阻害作用よりもむしろ活性化作用を有すると報告されている (Rampe & Kane, 1994)。さらに、これら化合物の光学異性体を用いて試験を行うと、S(+)-体は L-VDCC の活性化作用を有し、反対に R(-)-体は阻害作用を有することが明らかにされた (Franckowiak *et al.*, 1985; Gjorstrup *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1985)。

プラニジピンも、同様に 1,4-DHP 環の 4 位に不斉中心を有するため、2 種類の光学異性体が存在する (Fig. 1)。そこで本研究では、まずこれら異性体の薬理学的作用を、ラット摘出大動脈標本および麻酔下高血圧自然発症ラット (SHR) を用い検討した。

さらに、これら異性体のコンピュータによる安定構造計算予測を行い、従来から提唱されている 1,4-DHP の構造活性相関との類似性について考察を加えた。

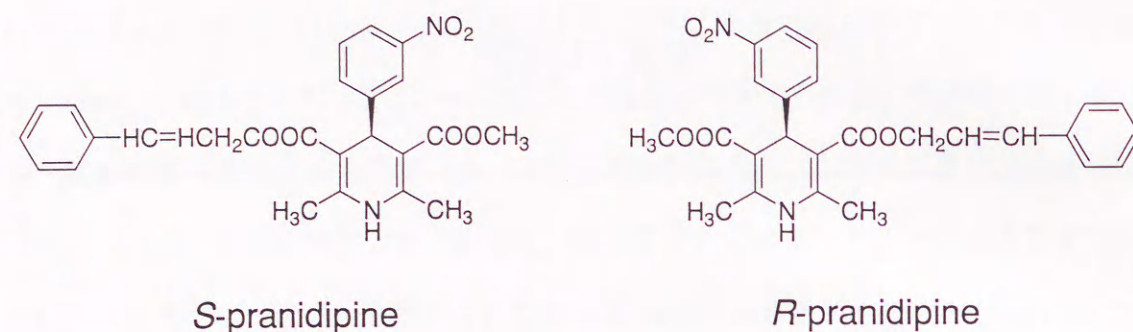


Fig. 1. Chemical structures of S- and R-pranidipine.

第1節 ラット摘出大動脈リング標本におけるカルシウム収縮に対する光学異性体の抑制効果

<方法>

本研究を通じて、実験動物は、大塚製薬株式会社で定めた「大塚製薬株式会社 動物実験に関する指針 (Guidelines for Animal Experimentation in Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.)」を遵守し取り扱った。体重 510-620 g の雄性 Wister ラット (日本チャールズリバー) をペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、1000 IU/kg のヘパリンを腹腔内投与した後、両側総頸動脈の切断により脱血死させた。直ちに、大動脈弓から横隔膜に至る胸部大動脈を摘出し、95% O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気した 37℃ の Krebs- Henseleit 栄養液 (K-H 液) で洗浄した。摘出した血管は、付着する脂肪組織を除去後、4-5 mm の幅でリング状に切り分けた。その後、リング標本を 37℃

の K-H 液 30 ml を含む通気オーガンバスに 1 g の負荷をかけて懸垂固定し、1 時間の平衡化の後実験に供した。

ノルエピネフリン (10⁻⁷ M) を用いて標本の収縮反応を安定化 (2 回) し、ノルエピネフリン存在下にアセチルコリン (10⁻⁶ M) を添加し、内皮細胞の存在を確認した。Ca²⁺-free-K-H 液にて 10 分毎に 3 回洗浄した後に、さらに等張性に Na⁺ を K⁺ で置換した 80 mM KCl-Ca²⁺-free-K-H 液中にて 10 分毎に 3 回洗浄し、標本を脱分極させた。そこに CaCl₂ (0.01~30 mM) を累積的に加え CaCl₂ 濃度-収縮曲線を得た。次に、K-H 液で約 1 時間洗浄安定化させ 80 mM KCl-Ca²⁺-free-K-H 液で 10 分毎に 3 回洗浄した後、標本を被験薬物で 30 分間処置し、再び CaCl₂ (0.01~30 mM) を累積的に加え CaCl₂ 濃度-収縮曲線を得た。被験薬物存在下の各 CaCl₂ 濃度に対する収縮反応は、被験薬物非存在下に得られた最大収縮に対する百分率で算出した。プラニジピン光学異性体の ED₅₀ 値は、各用量におけるそれぞれの平均値を用いて回帰曲線から求め、Schild 法 (Arunlakshana & Schild, 1959) および Van Rossum 法 (Van Rossum, 1963) に従って pA₂ 値を算出した。pA₂ 値は、被験薬物非存在下での CaCl₂ 濃度-収縮曲線を 2 倍高用量側に平行移動させるのに必要な競合的拮抗薬のモル濃度の negative logarithm として定義される値であり、プラニジピン光学異性体の効力比較に用いた。標本の等尺性張力変化は、圧トランスデューサー (UL20G, Minebea) で測定し、増幅アンプ (1206 B, NEC-San-ei) を介し熱ペンレコーダー (Recti-Horiz 8K, NEC-San-ei) 上に記録した。使用した栄養液の組成 (単位; mM) は下記の通りである。

K-H 液; NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, EDTA 0.03, Ascorbic Acid 0.06, Glucose 11.

Ca²⁺-free-K-H 液; 上記の K-H 液より CaCl₂ のみを除去し、EGTA 1 mM を添加した。

80 mM KCl-Ca²⁺-free-K-H 液; NaCl 43.9, KCl 80, 他は Ca²⁺-free-K-H 液と同様。但し、EGTA は添加しなかった。

＜結果＞

80 mM KCl によって脱分極させた摘出大動脈リング標本に累積的に CaCl_2 (0.01~30 mM) を適用すると濃度依存的な張力が発生し、 10^{-10} ~ 10^{-9} M の用量の S(+)-体は、この CaCl_2 濃度-収縮曲線を用量依存的に右方向に移動させた (Fig. 2, 上図)。一方、R(-)-体も CaCl_2 濃度-収縮曲線を用量依存的に右方向に移動させたが、その用量は 10^{-8} ~ 10^{-7} M であった。30 mM 以上の CaCl_2 は、溶解度等の問題で添加できなかったが、競合的拮抗作用を示しているものとみなし、これらのデータから S(+)-体および R(-)-体における拮抗作用の濃度の指標である pA_2 値を求めると、Schild 法では、S(+)-体は 9.90, R(-)-体は 8.27, Van Rossum 法では、S(+)-体は 10.15, R(-)-体は 8.44 であり、それぞれ 42.7 倍および 51.3 倍の開きが認められた。すなわち、S(+)-体の効力は、R(-)-体と比較し約 50 倍強いことが示唆された。

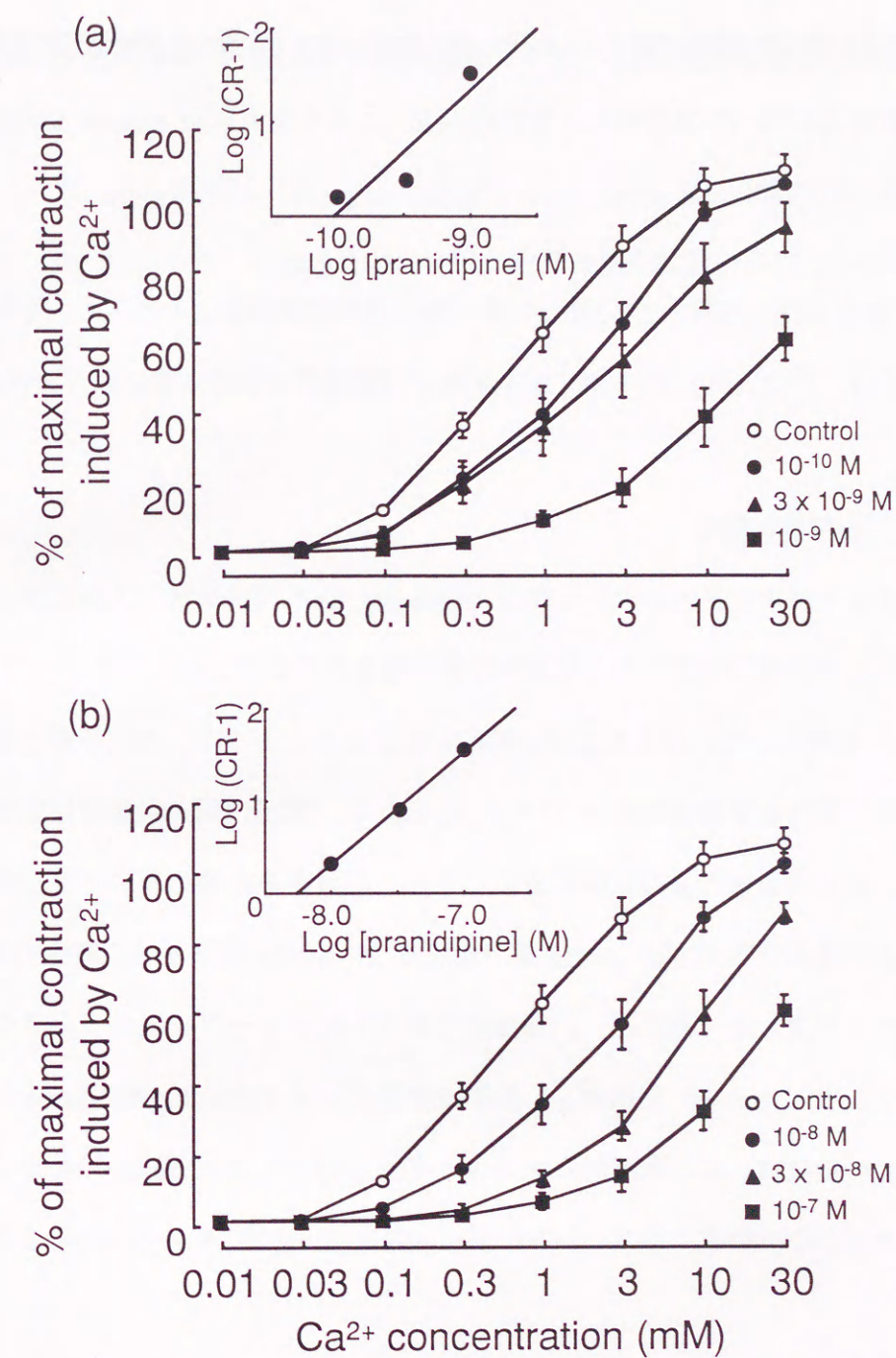


Fig. 2. Effects of S-isomer (10^{-10} - 10^{-9} M) (a) and R-isomer (10^{-8} - 10^{-7} M) (b) of pranidipine on calcium-induced vascular contraction in the isolated rat aorta.

Contraction was normalized with % of maximum tension of the control contraction. Corresponding Schild plot is shown in each diagram. Values are expressed as means \pm S.E. of six to eight preparations from different rats.

第2節 自然発症高血圧ラット (SHR) に対する降圧作用

＜方法＞

1) 使用動物

18 週齢の雄性 SHR (体重 ; 277-330 g) を (株) 星野試験動物より購入し, 1 週間の予備飼育終了後, ラセミ体, S(+)-体, R(-)-体および溶媒投与群の 4 群に振り分けた.

2) 血圧および心拍数の測定

ラットをベントバルビタールナトリウム (40 mg/kg, i.p.) で麻酔後, 大腿動脈および大腿静脈にそれぞれ血圧測定用および薬物静脈内投与用のポリエチレンチューブ (SP-55, Natsume) を挿入した. 血圧および心拍数の安定したところで, 大腿静脈に留置したチューブより薬物を累積的に投与 (1~30 μ g/kg) し, 降圧作用の用量作用曲線を求めた. また, 収縮期血圧および拡張期血圧ごとに, 用量作用曲線を用いて平行線検定を行い, その回帰式から ED-25 mmHg 値 (血圧を 25 mmHg 低下させる薬物用量) を求め, 効力比を計算した. 血圧は, 大腿動脈に挿入したチューブを圧トランスデューサー (MPU-0.5, NEC-San-ei) に接続し, 動脈圧増幅アンプ (1206B, NEC-San-ei) を介し測定した. 心拍数は, 血圧脈波からタコメーター (N4778, NEC-San-ei) を介し測定した. 血圧および心拍数は, 熱ペンレコーダー (Recti-Horiz 8K, NEC-San-ei) 上に記録した.

＜結果＞

血圧および心拍数の薬物投与前値には, 実験群間で有意な差はなかった. ラセミ体および S(+)-体は, 1~30 μ g/kg の累積投与で用量依存的な降圧作用を示した (Fig. 3). ラセミ体および S(+)-体の収縮期血圧における ED-25 mmHg 値は, それぞれ 2.5 および

1.4 μ g/kg, 拡張期血圧における ED-25 mmHg 値は, それぞれ 2.2 および 1.2 μ g/kg であった. ED-25 mmHg 値で比較すると, S(+)-体はラセミ体に比べ, 約 1.8 倍強い作用を示した. 一方, R(-)-体では, 30 μ g/kg の用量でも 25 mmHg 以上の降圧作用は認められなかった (Fig. 3). また, 心拍数については, 有意な変化は認められなかった (Fig. 3, 下図).

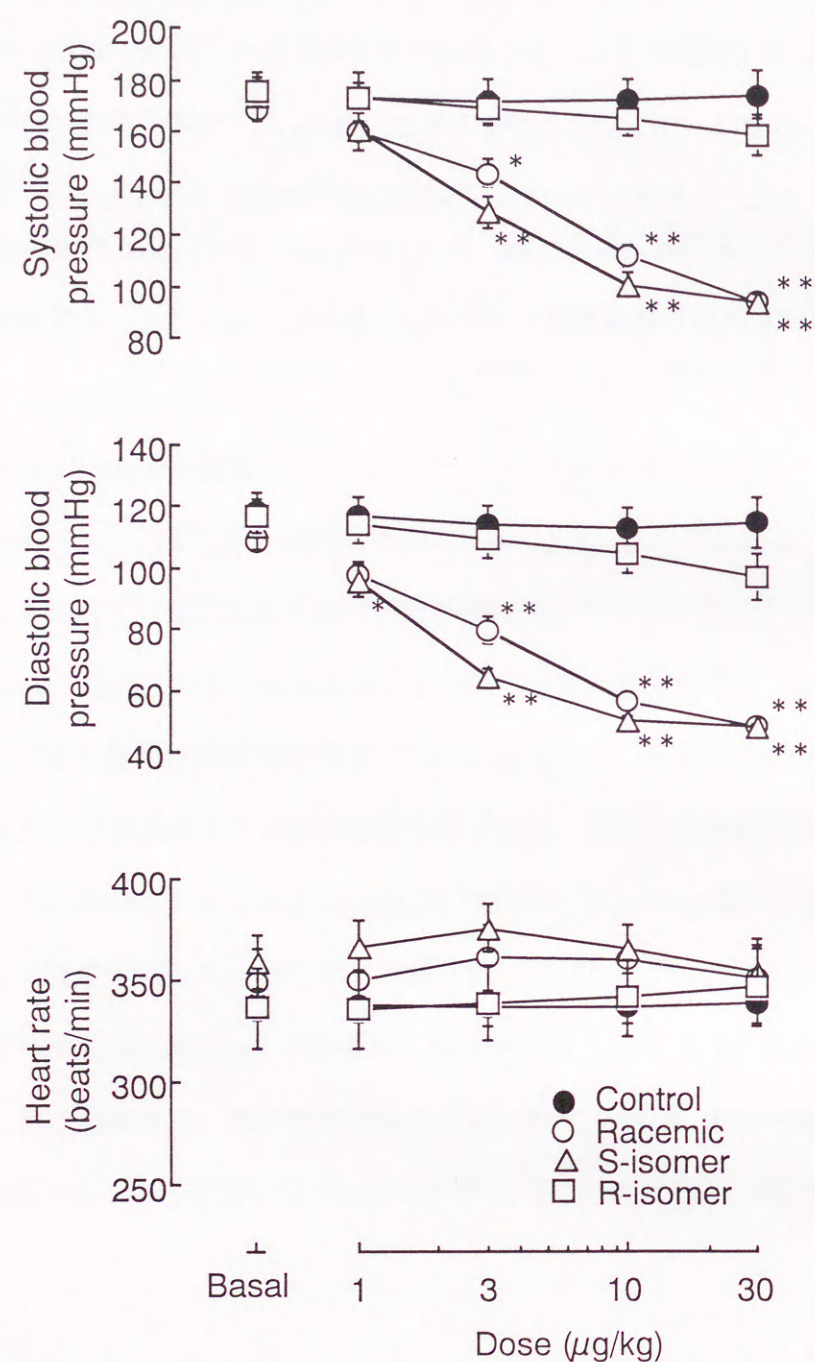


Fig. 3. Effects of racemic and optical-isomers of pranidipine on systolic (upper) and diastolic (middle) blood pressure and heart rate (lower) in the spontaneously hypertensive rats anesthetized with pentobarbital.

Values are expressed as means \pm S.E. of six rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated group (control).

第3節 プラニジピンの安定構造の計算

<方法>

QUANTA 97 ソフトパッケージを用いて化合物モデルを作成した。プラニジピンの安定構造は, MOPAC (semi-empirical molecular orbital program Version 6.0, Quantum Chemistry Program Exchange) の PM3 (Stewart, 1990) を用い計算した。

<結果>

プラニジピン光学異性体の安定構造の計算結果を, Fig. 4 (a) に示す。ジヒドロピリジン環は, 平面ボート構造であり, 4 位のフェニル基は, axial に位置し, かつジヒドロピリジン環に直角であった。また, シンナモイルエステル置換基およびメチルエステル置換基の有するカルボニル基部分は, ジヒドロピリジン環の二重結合に対し, それぞれ trans および cis の位置関係を示していた (Fig. 4, b)。

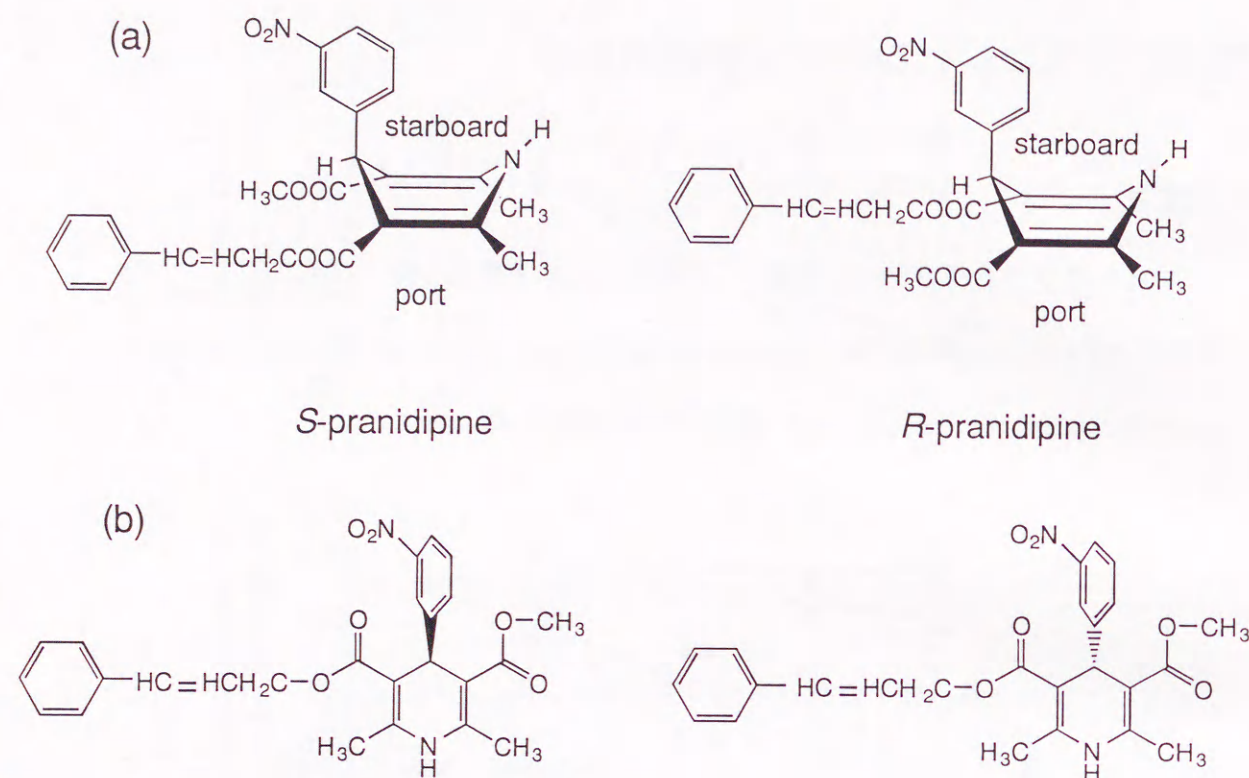


Fig. 4. The stable conformers of prandipine optical-isomers. (a) Boat conformation of the 1,4-dihydropyridine ring. (b) The carbonyl groups against the double bonds of the 1,4-dihydropyridine ring.

第4節 考察

1,4-DHP 誘導体は、光学異性体を有する化合物が多く、作用力価が両異性体で異なる化合物の他、2種の異性体がカルシウムチャネルの拮抗薬と作動薬という相反する作用を有する化合物が報告されている (Goldmann & Stoltefuss, 1991). プラニジピンも、同様に dihydropyridine 環の4位に不斉中心を有するため、2種類の光学異性体が存在する。そこで本研究では、まずこれら異性体の薬理学的作用を検討した。ラット摘出大動脈標本において、両異性体は、共に L-VDCC を介した収縮に対する抑制作用

を示し、その活性は S(+)-体の方が、R(-)-体よりも約 50 倍強かった。さらに、S(+)-体は、麻酔下 SHR において降圧作用を示し、その強さはラセミ体の約 1.8 倍であった。一方、R(-)-体は、S(+)-体やラセミ体と同じ用量を投与しても、降圧作用を示さなかった。以上の結果から、プラニジピンの降圧作用は、主に S(+)-体の L-VDCC 抑制作用に起因することが示された。

構造活性相関の研究から、1,4-DHP 誘導体の薬効を規定する重要な立体構造が明らかにされてきている。プラニジピンの構造は、PM3 を用いた計算によると、他の 1,4-DHP 誘導体と同様に (Goldmann & Stoltefuss, 1991; Hoffman & Cimiraglia, 1988)、ニトロフェニル基が axial の位置にあり、かつジヒドロピリジン環がフラットなボート型を示したとき最も安定になる。また、プラニジピンの降圧作用が主に S(+)-体に起因することは、Goldman と Stoltefuss により提唱された 1,4-DHP の構造活性相関の結果ともよく一致する (Goldmann & Stoltefuss, 1991). 例えば、3位と5位のエステル基は、対称型よりも非対称型のほうがより活性が高く、その非対称型のエステル基は、大きな分子量の置換基が左舷（ジヒドロピリジン環をボートとし、メチルフェニル基を船首と見立てた場合）に位置するほうが、より活性が高くなる。プラニジピンの場合も、分子量の大きなシンナモイルエステル基は、S(+)-体では左舷に位置し、R(-)-体では右舷に位置する。また、右舷のより小さなエステル基は、L-VDCC の結合部位との水素結合に重要であり、左舷のより大きなエステル基は、その脂溶性から、結合部位の脂溶性領域を占有することが報告されている (Goldmann & Stoltefuss, 1991). したがって、プラニジピンは、メチルエステル基が結合部位との水素結合に寄与し、シンナモイルエステル基が結合部位の脂溶性領域を占有している可能性が推測される。さらに、安定構造計算予測によると、シンナモイルエステル置換基およびメチルエステル置換基の有するカルボニル基部分は、ジヒドロピリジン環の二重結合に対し、それぞれ trans および cis の位置関係を示していた。この配置は、1,4-DHP の X 線構造解析の結果と

も一致している (Goldmann & Stoltefuss, 1991). また, メチルエステル置換基の *cis* の配置は, L-VDCC の結合部位との水素結合を考えた場合, 無理のない配置であると報告されている (Goldmann & Stoltefuss, 1991).

1,4-DHP 誘導体のうち L-VDCC を作動させる化合物は, 左舷に分子量の大きな脂溶性アルキル基を有さないか, もしくはその位置に部分的に負の荷電を有することが多い. YC-170 のように, ジヒドロピリジン環の 3 位と 5 位の位置に大きな分子量の置換基を有するが, 弱いながら L-VDCC の作動薬として働く場合もある (Nakaya *et al.*, 1986). プラニジピンは, 左舷に分子量の大きなシンナモイルエステル基を有するが, その置換基は負の荷電を帯びていないため, 両異性体とも L-VDCC の刺激作用を示さなかったと考えられる.

L-VDCC の拮抗薬は, 基本的に陰性変時作用および陰性変力作用を有する. しかし, *in vivo* の状態では, 陰性変時作用は圧受容器反射により相殺され, むしろ反射性頻脈を引き起こす場合が多い. SHR を用いた本試験では, プラニジピンはラセミ体および光学異性体ともに, 心拍数に有意な影響を与えなかった. これは, プラニジピンが他のジヒドロピリジンであるニフェジピンやアムロジピンと比較し, 陰性変時作用が強いという特性に起因するのかもしれない (Ohura *et al.*, 1997).

以上, 本試験結果から, プラニジピンは両異性体共にカルシウム拮抗作用を有し, その作用には, 主に S(+)-体が関与していることが示唆された. また, この結果は, 従来から提唱されている 1,4-DHP の構造活性相関と良く一致していた.

第2章 プラニジピンによる cGMP 非依存性 NO 血管弛緩反応の増強作用

1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬は, 他のクラスのカルシウム拮抗薬と比較し, 陰性変力作用が弱く, 血管選択性の高い薬剤であると言われている (Taira, 1987). プラニジピンは, さらに従来のカルシウム拮抗薬にない特異な作用を有することが見出されている. すなわちプラニジピンは, プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ またはノルエピネフリン処置により収縮させたラット摘出大動脈標本において, アセチルコリン, ヒスタミンあるいは ATP による内皮依存性弛緩反応を延長させる (Nakayama *et al.*, 1993). この作用は, プラニジピン特有の作用であり, その他のカルシウム拮抗薬であるニフェジピン, ベラパミルおよびジルチアゼムなどでは認められない (Nakayama *et al.*, 1993).

そこで本研究では, このプラニジピンの作用のメカニズムを解明するために, まずプロスタグランジン類および一酸化窒素 (NO) の関与, また血管トーンに影響を与える受容体への親和性について検討した. その結果, NO の関与が示唆されたことから, 血管標本中の NO 合成酵素活性およびサイクリック GMP (cGMP) 含量の測定を行った. しかし, 予想に反しプラニジピンは, NO 合成酵素活性および cGMP 含量に影響を与えなかったことから, さらに Ca 感受性ならびにカルシウム活性化カリウムチャネルの関与について検討を加えた.

第1節 摘出大動脈リング標本における内皮依存性弛緩反応の延長作用

＜方法＞

8 - 12 週齢（体重 280 - 400 g）の雄性 Wister ラット（日本チャールズリバー）をペントバルビタール（50mg/kg, i.p.）で麻酔し、1000 IU/kg のヘパリンを腹腔内投与した後、両側総頸動脈の切断により脱血死させた。直ちに、大動脈弓から横隔膜に至る胸部大動脈を摘出し、95% O₂-5% CO₂の混合ガスを通気した 37℃の K-H 液（組成は第 1 章に記載）で洗浄した。摘出した血管は、付着する脂肪組織を除去後、4-5 mm の幅でリング状に切り分けた。その後、37℃の K-H 液 30 ml を含むオーガンバスに 1 g の負荷をかけて懸垂固定し、1 時間の平衡化の後、以下の＜実験 1-3＞に供した。標本の等尺性張力変化は、圧トランスデューサー（UL20G, Minebea）で測定し、増幅アンプ（1206 B, NEC-San-ei）を介し熱ペンレコーダー（Recti-Horiz 8K, NEC-San-ei）上に記録した。

＜実験 1＞

10⁻⁸ M のプラニジピン、10⁻⁸, 10⁻⁷ M のアムロジピン、あるいはその溶媒である dimethylsulfoxide (DMSO) のいずれかをオーガンバス内に添加した。20 分後、10⁻⁵ M のプロスタグランジン F_{2α}で収縮させ、張力が安定したところで 10⁻⁶ M のアセチルコリンを添加し、20 分間、張力の変化を観察した。

＜実験 2＞

プラニジピンによる反応に対するプロスタグランジン類の関与について検討するため、10⁻⁵ M のインドメタシンを、プラニジピン投与時あるいはアセチルコリン投与後に張力が安定したところで添加した。

＜実験 3＞

プラニジピンによる反応に対する NO の関与について検討するため、NO 合成阻害薬である 10⁻⁴ M の N^G-nitro-L-arginine を、プラニジピンあるいは DMSO 投与時に添加し、実験 1 と同様に実験を行った。

＜結果＞

ラット大動脈リング標本を、10⁻⁵ M のプロスタグランジン F_{2α}で収縮させた状態で、10⁻⁶ M のアセチルコリンを添加すると、直ちに弛緩反応が起こり、その後弛緩は徐々に回復してきた (Fig. 5, 上図)。10⁻⁸ M のプラニジピンをプロスタグランジン F_{2α}投与 20 分前に前処置しておく、basal の張力には影響を与えず、プロスタグランジン F_{2α}の収縮反応はわずかに抑制された（コントロール反応の約 90%）。この状態で、アセチルコリンを添加すると、プラニジピン非存在下よりも持続した弛緩反応が観察された (Fig. 5, 下左図)。一方、10⁻⁸ M のアムロジピンの処置は、アセチルコリンの反応に影響を与えなかった (Fig. 5, 下右図)。10⁻⁷ M のアムロジピンでも同様であった（データ未掲載）。

このプラニジピンによる弛緩反応延長作用は、10⁻⁵ M のインドメタシンをプラニジピン添加時 (Fig. 6, 上図) あるいはアセチルコリンによる弛緩が生じている時 (Fig. 6, 下図) に投与しても、影響を受けなかった。

アセチルコリンによる弛緩反応は、プラニジピン処置無処置にかかわらず、NO 合成阻害薬である 10^{-4} M の N^G -nitro-L-arginine によりほぼ完全に消失した (Fig. 7).

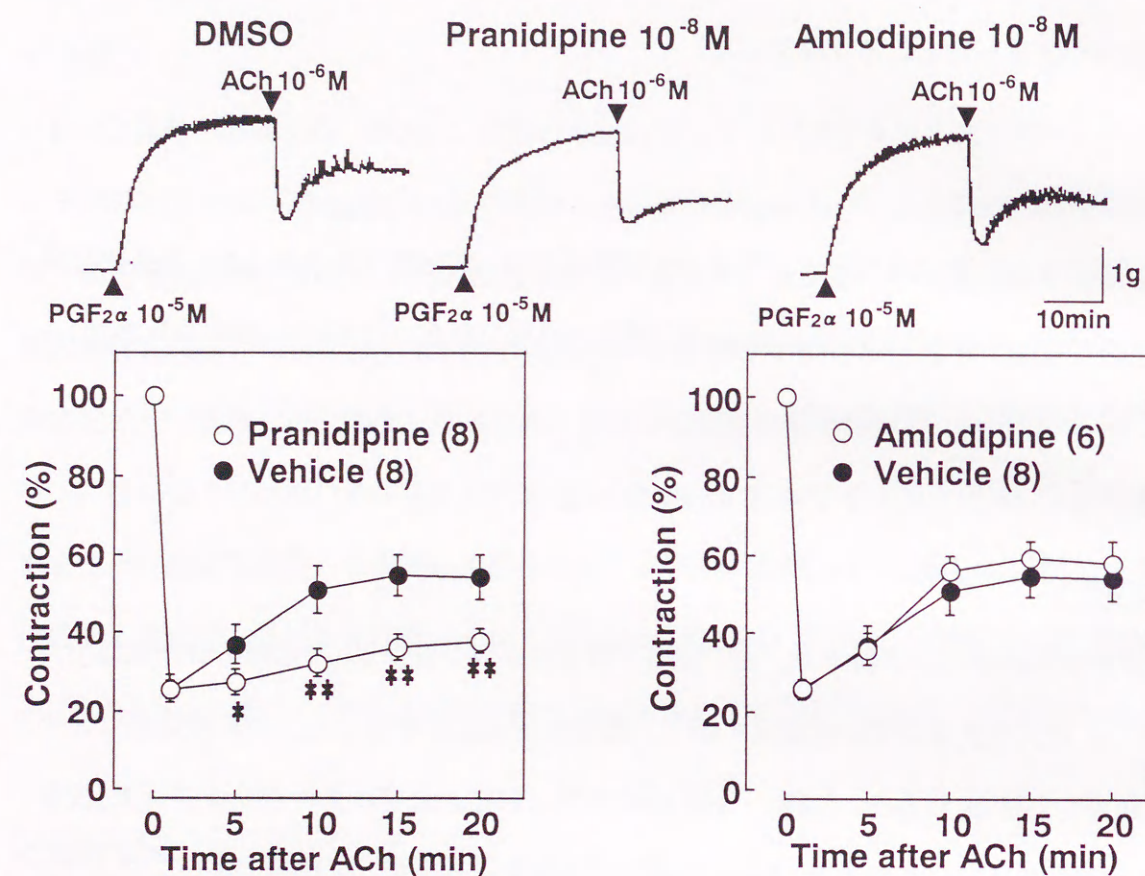


Fig. 5. Effects of pranidipine and amlodipine on acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta.

(Upper panel) Typical traces of acetylcholine (ACh)-induced relaxation in the rat aorta contracted with 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) in the presence of 10^{-8} M pranidipine, 10^{-8} M amlodipine or vehicle (0.13% DMSO).

(Lower panel) Time courses of ACh-induced relaxation. Values are expressed as mean \pm S.E. of 8, 6 and 8 experiments for pranidipine, amlodipine and vehicle, respectively. All values are standardized by tensions just before the treatment with ACh at 100%. The tensions of pranidipine, amlodipine and vehicle are 2.4 ± 0.1 , 3.2 ± 0.3 and 3.6 ± 0.3 g, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated group.

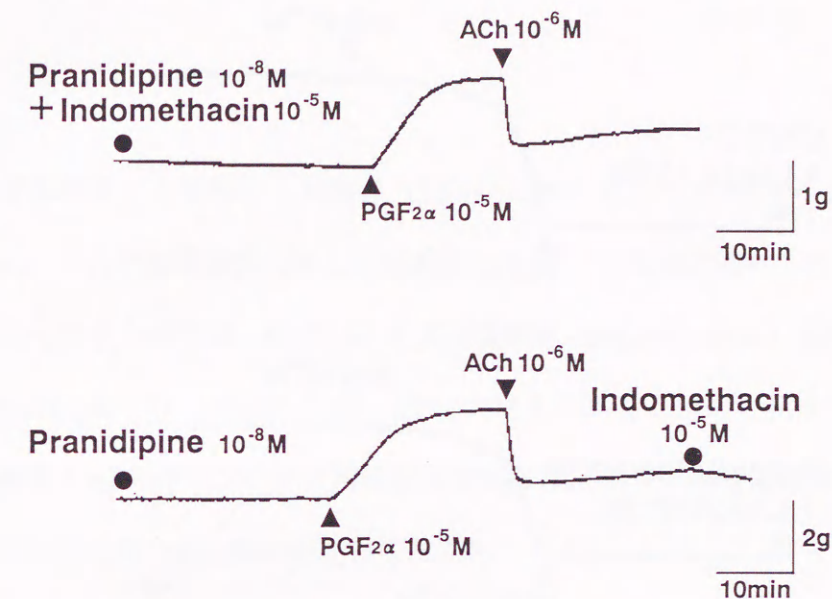


Fig. 6. Effects of indomethacin on pranidipine-induced prolongation of acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta.

(Upper panel) A typical trace of pranidipine-induced prolongation of acetylcholine (ACh)-induced relaxation in the rat aorta contracted with 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) in the presence of 10^{-5} M indomethacin.

(Lower panel) A typical trace of effect of indomethacin on pranidipine-induced prolongation of ACh-induced relaxation.

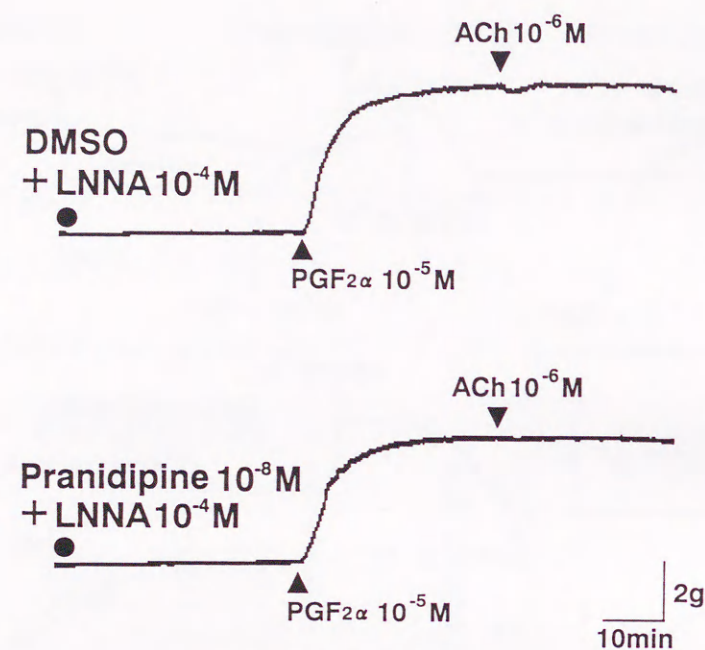


Fig. 7. Effects of N^G -nitro-L-arginine on acetylcholine-induced relaxation of the rat aorta in the absence or presence of pranidipine.

Typical traces of acetylcholine (ACh)-induced relaxation of the rat aorta contracted with 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) treated with 10^{-4} M N^G -nitro-L-arginine (LNNA) in the absence (upper panel) or presence (lower panel) of 10^{-8} M pranidipine.

第2節 内皮由来構成型 NO 合成酵素 (cNOS) 活性に対する作用

<方法>

ブタ内皮細胞を、大動脈から剥離し、20%ウシ胎児血清 (Gibco Biological Research Laboratories) を入れた培養液 199 (日水製薬) で 17-18 回継代培養した。培養内皮細胞を、PBS(-)で洗い回収し、ホモジナイズ用緩衝液 (dithiothreitol 0.1 mM, EDTA 1 mM, HEPES 50 mM, pH 7.4) で懸濁した後、200 g で 5 分間の遠心処理で洗浄した。その後、沈殿細胞層を 5 ml のホモジナイズ用緩衝液で懸濁し、30 秒の超音波処理を行い、これをブタ内皮細胞由来 cNOS 酵素液として用いた。

反応液 ($CaCl_2$ 1 mM, FAD 1 μ M, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin 10 μ M, NADPH 1 mM, calmodulin 0.6 μ M, dithiothreitol 0.1 mM, EDTA 1 mM, HEPES 50 mM, glycerol 3%, pH 7.4), 酵素液 (蛋白量として 25-40 μ g), および 10^{-9} から 10^{-7} M のプラニジピンまたは溶媒 (DMSO, 0.1 %) を混合した後、37℃の恒温槽内で 1 μ M (37 kBq) の L-[3 H]-アルギニンを添加し、20 分間インキュベーションした後、氷冷した 0.5 ml の反応停止液 (EGTA 10 mM, HEPES 100 mM, pH 5.5) を添加した。未反応の L-[3 H]-アルギニンを、陽イオン交換樹脂 (AG50W-X4, Na-form) に吸着させた後、1000 g で 5 分間遠心し、その上清の [3 H]-シトルリンの放射線活性を、液体シンチレーションカウンター (Aloca) で計測した。cNOS の特異的活性は、1 mM の N^G -nitro-L-arginine 存在下で上記アッセイを行い、その値を差し引くことにより求めた。

<結果>

培養ブタ内皮細胞から得られた cNOS の活性は、アルギニンからシトルリンへの変換量として表した。10⁻⁹, 10⁻⁸ および 10⁻⁷ M の濃度のプラニジピンは、cNOS 活性に影響を与えなかった (Table 1)。

Table 1
Effect of pranidipine on endothelial cNOS activity

	Vehicle	Pranidipine concentration		
		10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M
ecNOS activity	31.5 ± 3.3	30.2 ± 4.7	30.9 ± 4.3	28.6 ± 3.2
(pmol/mg/min)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)

Homogenate of cultured porcine endothelial cells was used as endothelial cNOS (ecNOS) enzyme preparation. Values are expressed as mean ± S.E. of 5 preparations.

第3節 摘出大動脈リング標本における cGMP 含量に対する作用

<方法>

実験プロトコールは第1節<実験1>に準じて行い、プラニジピン処置群および DMSO 処置群 (コントロール群) を作成した。アセチルコリン添加後 (1, 5, 10, 20 分後) に標本をオーガンバスから回収し、直ちに液体窒素に入れた。標本を、氷冷した 0.1 N HCl 中でガラスホモジナイザーを使い破碎し、さらに超音波処理により懸濁させた。懸濁液を、5 分間煮沸し、1000 g で 15 分間遠心して、除蛋白した。その上清中の cGMP を、ラジオイムノアッセイキット (Yamasa) を用い定量し、標本中の cGMP 含量を算出した。

<結果>

コントロール群では、組織中 cGMP 含量は、10⁻⁶ M のアセチルコリン処置により一過性に上昇し、その後急速に低下した。この経時的变化は、10⁻⁸ M のプラニジピン処置下でも観察され、コントロール群と差は認められなかった (Fig. 8)。

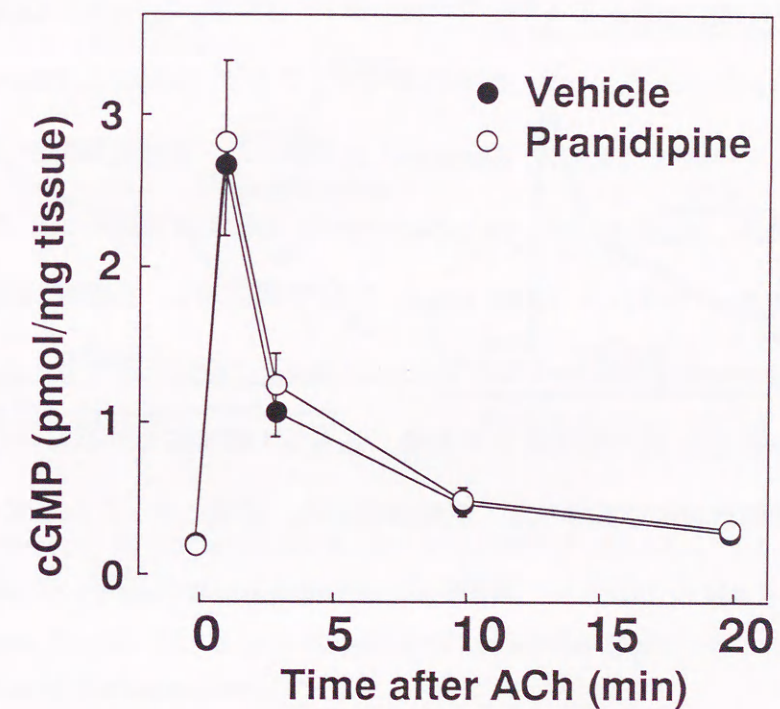


Fig. 8. Effects of pranidipine on time course of tissue cyclic GMP contents during acetylcholine-induced relaxation of the rat aorta contracted with 10⁻⁵ M prostaglandin F_{2α}.

Values are expressed as mean ± S.E. of 12-13 preparations. cGMP; cyclic GMP, Ach; acetylcholine.

第4節 血管平滑筋スキンドファイバー標本における収縮タンパクのカルシウム感受性および cGMP に対する直接作用

<方法>

300–350 g の雄性 Wistar 系ラット (SLC) を、ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、両側総頸動脈の切断により脱血死させた。直ちに、腸間膜動脈を採取し、実体顕微鏡下で、小切片 (0.1–0.2 × 1 mm) を作製した。小切片を、2 本のタングステン針の先に結び付け、一方を圧トランスデューサー (AE801, Senso Nor) に接続した。標本の収縮は、圧トランスデューサーからの信号を、アンプ (EF601G, Nihon Kohden) を介し増幅し、レコーダー (LR4110, Yokogawa) に記録した。まず弛緩溶液 (potassium methansulfonate 4 mM, EGTA 40 mM, phosphocreatine 5 mM, Tris maleic acid 20 mM, pH 6.8) 中にて、標本を α -トキシシン (5000 U/ml) で 30 分間処理し、細胞膜透過性を上昇させスキンド標本とした (Horiuti, 1988; Takeuchi *et al.*, 1996)。続いて、 α -トキシシンを弛緩溶液で洗浄除去し 10 分間安定させた後、スキンド標本におけるカルシウムによる収縮反応を、収縮溶液中で記録した。収縮溶液には、遊離カルシウム濃度を $0.5 \mu\text{M}$ に固定するため、4 mM の EGTA に一定量の Ca-methansulfonate を添加した (Harafuji & Ogawa, 1980)。

<結果>

α -トキシシンによるスキンド血管標本に $0.5 \mu\text{M}$ のカルシウムを添加すると、一過性に収縮した後、持続性の収縮が認められた。収縮が安定したところでプラニジピンを添加したが、収縮は影響を受けず、また cGMP による弛緩反応もプラニジピンにより増強されなかった (Fig. 9, 左図)。 10^{-7} M のプラニジピンを、 $0.5 \mu\text{M}$ のカルシウムを

添加する 20 分前に投与したが、カルシウムによる収縮や $0.1 - 1.0 \mu\text{M}$ の cGMP による弛緩反応に影響は見られなかった (Fig. 9, 右図)。以上、プラニジピンは、標本のカルシウム感受性および cGMP 感受性に影響を与えなかった。

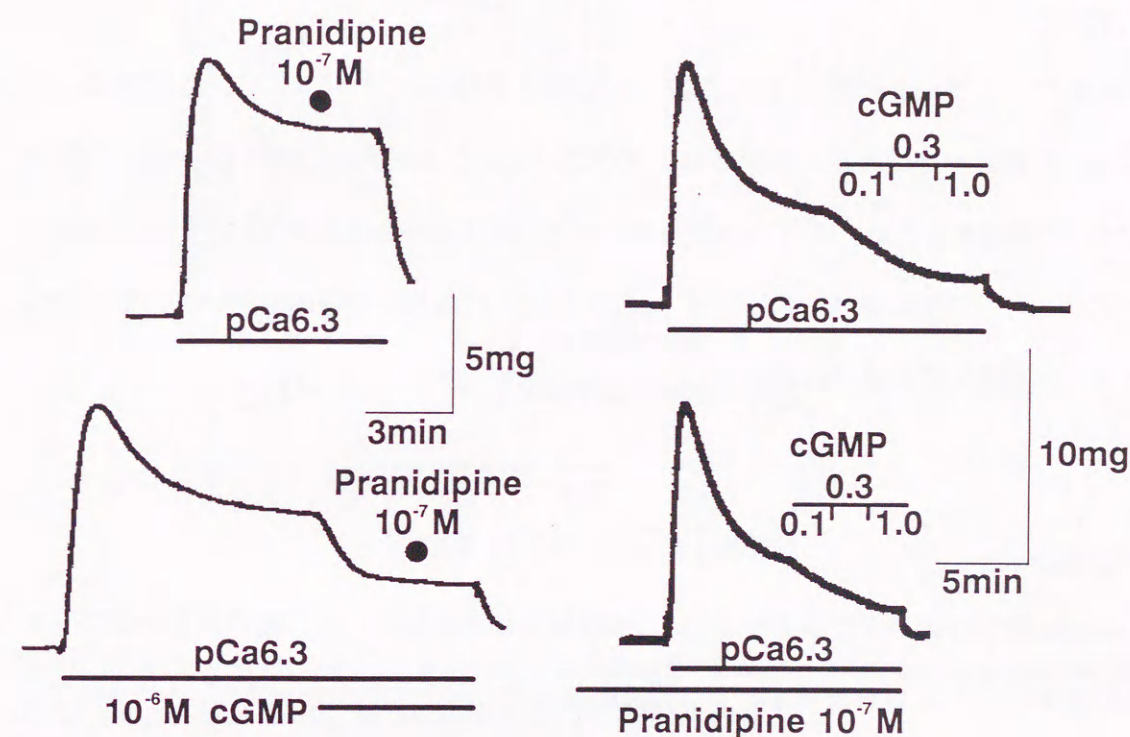


Fig.9. Effects of 10^{-7} M pranidipine on calcium sensitivity of contractile elements and sensitivity to cyclic GMP in skinned vascular muscle preparations.

(Left panel) $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ Ca (pCa 6.3)-induced contraction (upper) and 10^{-6} M cyclic GMP (cGMP)-induced relaxation (lower).

(Right panel) pCa 6.3-induced contraction and 10^{-7} to 10^{-6} M cGMP-induced relaxation in the absence (upper) and presence of (lower) pranidipine. Pranidipine at a concentration of 10^{-7} M was added 20 min before pCa 6.3-challenge.

第5節 摘出大動脈リング標本のメチレンブルー処置下における内皮依存性弛緩反応増強作用

＜方法＞

試験プロトコールは第1節＜実験1＞に準じて行い、プラニジピン処置群およびDMSO処置群を作成した。本節では、プラニジピンによる反応に対するcGMPの関与について検討するため、グアニル酸シクラーゼ活性を完全に阻害する 10^{-5} Mのメチレンブルーを、プラニジピンあるいはDMSO投与時に添加した標本を用いて、アセチルコリンの弛緩反応を検討した。

＜結果＞

10^{-5} Mのプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ により収縮させた状態で、 10^{-6} Mのアセチルコリンを投与すると、コントロール群では弛緩はまったく認められなかったが、 10^{-8} Mのプラニジピン処置群では、小さいが明らかな弛緩反応が認められた (Fig. 10)。

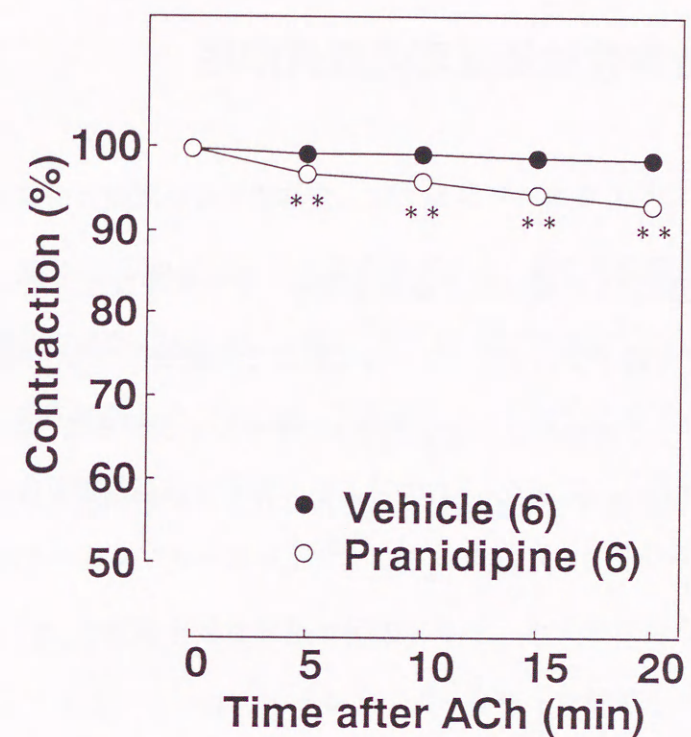


Fig. 10. Effects of pranidipine on acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta contracted with 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the presence of 10^{-5} M methylene blue.

Values are expressed as mean \pm S.E. of 6 preparations. All values are standardized by tension just before treatment with acetylcholine (ACh), and set at 100%. The tensions in the presence and absence of pranidipine are 4.1 ± 0.1 and 3.9 ± 0.2 g, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated group.

第6節 内皮除去摘出大動脈リング標本におけるニトログリセリン誘発内皮依存性弛緩反応の延長作用

＜方法＞

＜実験1＞

血管内皮除去を行った摘出大動脈リング標本を用い、アセチルコリンをニトログリセリンに変え、第1節＜実験1＞のプロトコールに準じて実験を行った (Fig. 11). 内皮細胞の除去は、血管リング内部をピンセットでローテーションすることにより行い、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ で収縮させた状態でアセチルコリンの反応が出ないことにより確認した。

＜実験2＞

プラニジピンによるニトログリセリンに対する反応における cGMP の関与について検討するため、グアニル酸シクラーゼ活性を完全に阻害する 10^{-5} M のメチレンブルーを、プラニジピンあるいは DMSO 投与時に添加し、比較検討した (Fig. 12). また、ニトログリセリン処置後 (1 および 20 分後) の組織中の cGMP 含量を、薬物無処置群、プラニジピン処置群、プラニジピンおよびメチレンブルー処置群で測定した。組織中の cGMP 含量の定量は、第3節の方法に準じた (Fig. 13).

＜実験3＞

メチレンブルー存在下で残存したニトログリセリンによる弛緩反応におけるカルシウム活性化カリウムチャネルの関与について検討を行うため、カルシウム活性化カリ

ウムチャネル阻害剤である 10^{-7} M のイベリオトキシンおよびカリブドトキシンを前処置し、その影響を検討した (Fig. 14).

＜結果＞

血管内皮除去大動脈リング標本を、 10^{-5} M のプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ で収縮させた状態で、 10^{-7} M のニトログリセリンを添加すると、直ちに弛緩反応が起こり、その後、徐々に回復してきた (Fig. 11, 上図). 10^{-8} M のプラニジピンは、ニトログリセリンによる弛緩反応を延長した (Fig. 11, 下左図). 一方 10^{-8} M のアムロジピンは、ニトログリセリンによる弛緩反応に影響を与えなかった (Fig. 11, 下右図).

10^{-5} M のメチレンブルー存在下で、 10^{-7} M のニトログリセリンを 10^{-5} M のプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ で収縮させた状態で添加すると、わずかながら弛緩反応が認められた (Fig. 12). プラニジピンは、メチレンブルー存在下で認められたこのニトログリセリンの反応を増強した (Fig. 12).

Fig. 13 に示したように、 10^{-7} M のニトログリセリンは、血管組織中の cGMP 含量を有意に増加させた。 10^{-5} M のメチレンブルーは、プラニジピン処置の有無にかかわらず、その増加をほぼ完全に抑制した。

メチレンブルー存在下に残存したニトログリセリンによる弛緩反応は、カルシウム活性化カリウムチャネル阻害剤であるイベリオトキシンにより完全に消失した (Fig. 14). プラニジピンは、イベリオトキシン存在下においても、有意な弛緩反応を示した (Fig. 14). 同様の結果は、他のカルシウム活性化カリウムチャネル阻害剤であるカリブドトキシンを用いた実験においても確認された (データ省略).

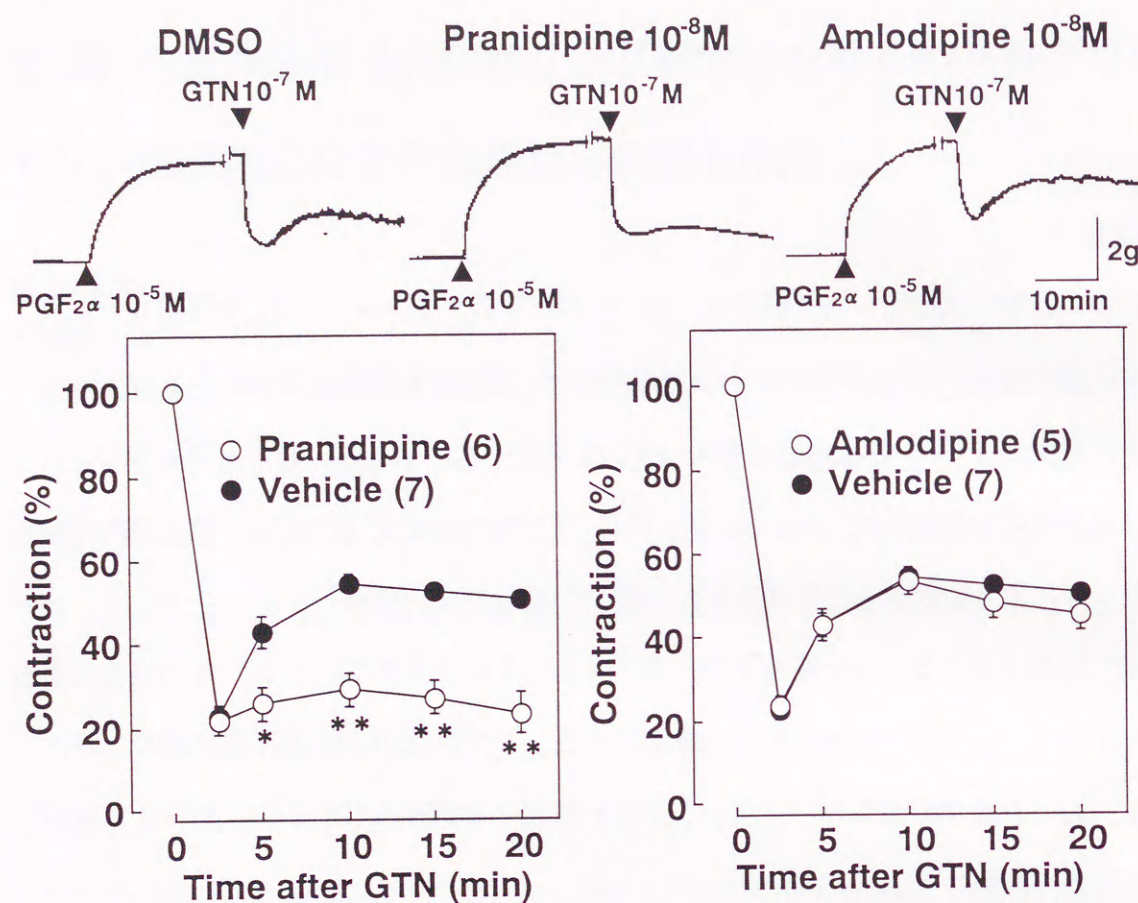


Fig. 11. Effects of pranidipine and amlodipine on glyceryl trinitrate-induced relaxation in the endothelium-denuded rat aorta.

(Upper panel) Typical traces of 10^{-7} M glyceryl trinitrate (GTN)-induced relaxation in the endothelium-denuded rat aorta contracted with 10^{-5} M prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_2\alpha$) in the presence of 10^{-8} M pranidipine, 10^{-8} M amlodipine and vehicle (0.13% DMSO), respectively.

(Lower panel) Time course of GTN-induced relaxation. Values are expressed as mean \pm S.E. of 6, 5 and 7 preparations for pranidipine, amlodipine and vehicle, respectively. All values are standardized by the tensions just before the treatment with GTN, at 100%. The tensions of pranidipine, amlodipine and vehicle are 3.5 ± 0.2 , 3.4 ± 0.3 and 3.1 ± 0.2 g, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated group.

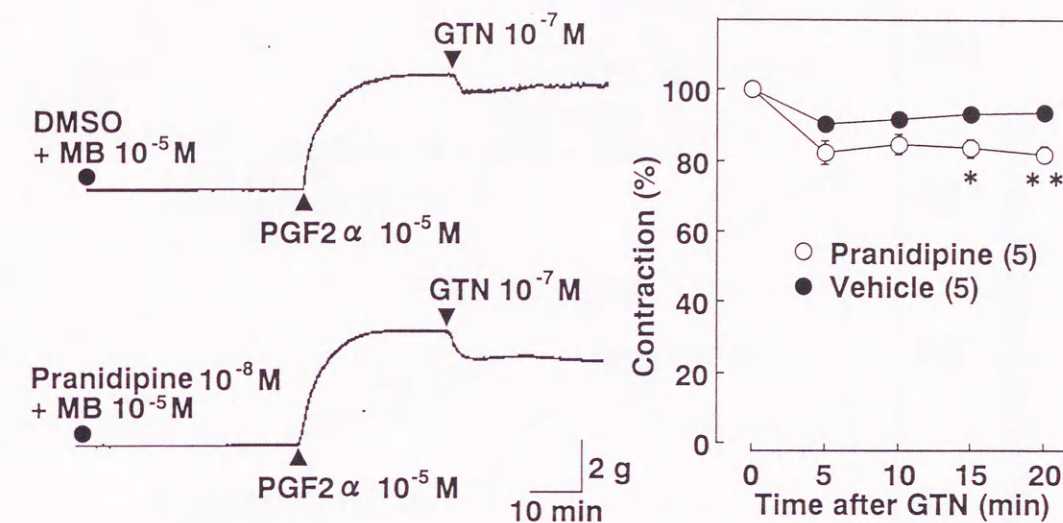


Fig. 12. Effects of pranidipine on glyceryl trinitrate-induced relaxation of the rat aorta in the presence of methylene blue.

(Left panel) Typical traces of glyceryl trinitrate (GTN)-induced relaxation of the endothelium-denuded rat aorta contracted with 10^{-5} M prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_2\alpha$) treated with 10^{-5} M methylene blue (MB) in the absence (upper) or presence (lower) of 10^{-8} M pranidipine.

(Right panel) Values are expressed as mean \pm S.E. of 5 preparations. All values are standardized by the tensions just before the treatment with GTN, at 100%. The tensions in the presence and absence of pranidipine are 3.7 ± 0.2 and 4.0 ± 0.1 g, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated group.

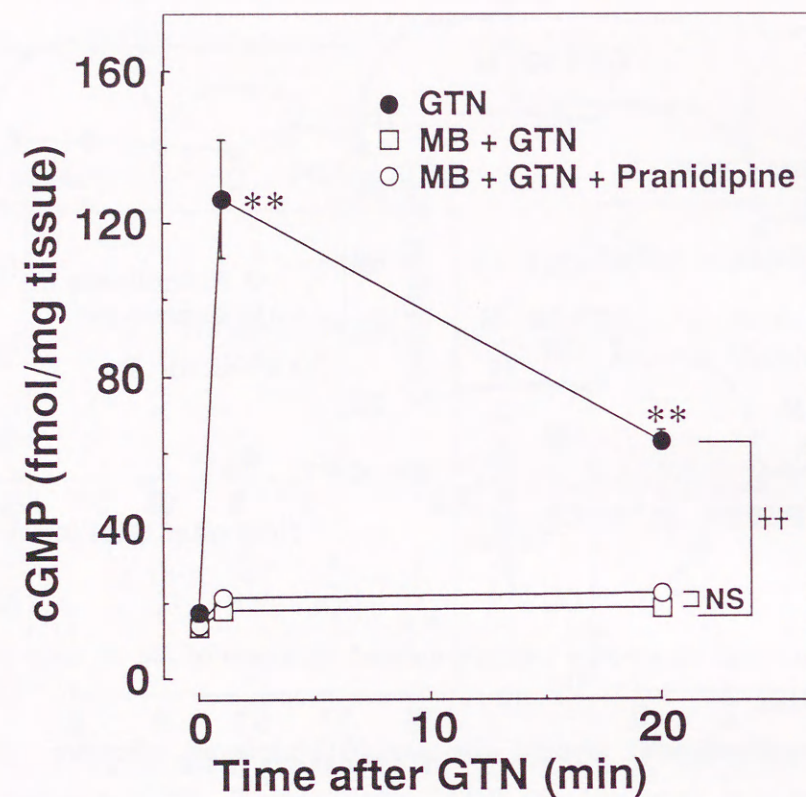


Fig. 13. Effects of pranidipine on time course of tissue cyclic GMP contents during 10^{-7} M glyceryl trinitrate-induced relaxation in the endothelium-denuded rat aorta contracted with 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the presence of 10^{-5} M methylene blue.

Values are expressed as mean \pm S.E. of 7 preparations. ++ $P < 0.01$ vs. the MB + GTN group. ** $P < 0.01$ vs. the MB + GTN at respective time point. cGMP; cyclic GMP, GTN; glyceryl trinitrate, $PGF_{2\alpha}$; prostaglandin $F_{2\alpha}$, MB; methylene blue.

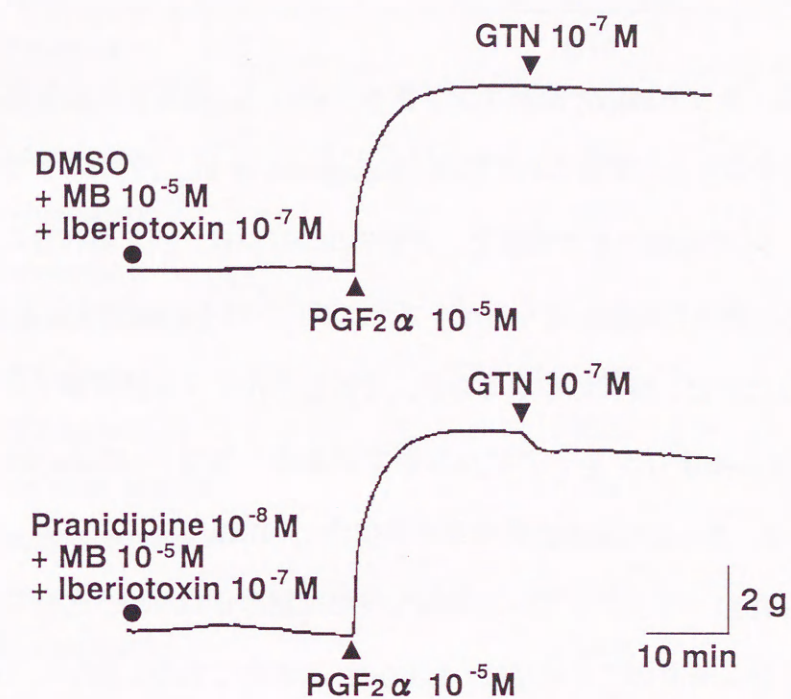


Fig. 14. Effects of pranidipine on glyceryl trinitrate-induced relaxation in the rat aorta in the presence of methylene blue and iberiotoxin.

Typical traces of glyceryl trinitrate (GTN)-induced relaxation of the endothelium-denuded rat aorta contracted with 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) treated with 10^{-5} M methylene blue (MB) and 10^{-7} M iberiotoxin in the absence (upper) or presence (lower) of 10^{-8} M pranidipine.

第7節 考察

プラニジピンは、ラット摘出大動脈リング標本において、内皮依存性弛緩反応を延長させる作用を有することが報告されている (Nakayama *et al.*, 1993). すなわち、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ で収縮させた状態で、アセチルコリンは、内皮依存性の弛緩反応を示し、その反応は徐々に回復してくるが、プラニジピンはその弛緩反応を延長する。この作用は、プラニジピン特有の作用であり、その他カルシウム拮抗薬であるニフェジピン、ベラパミルおよびジルチアゼムなどでは認められない (Nakayama *et al.*, 1993). 本研究では、さらに代表的な長時間作用型の 1,4-DHP であるアムロジピンとの比較検討をも行ったが、プラニジピンと同様な作用は認められなかった。これらの結果から、プラニジピン特有のこの作用は、L-VDCC の阻害に依存しないことが示唆された。また、血管内皮細胞には、L-VDCC が存在しないことも報告されている (Nilius *et al.*, 1997).

内皮依存性弛緩反応は、主に内皮より産生される NO および血管拡張性プロスタグランジン類により惹起される。そこで、プラニジピンによる弛緩増強作用に対するこれら内皮依存性弛緩因子の関与について検討した。まず、プラニジピンのアドレナリン α および β 、ムスカリン、セロトニン、アンジオテンシン II、トロンボキサン A_2 、アデノシン、バソプレシン V_1 レセプターなどの血管収縮および弛緩に関するレセプターに対する親和性は、この減少を説明するには非常に低いことが確認されている (Table 2). また、プラニジピンの作用は、シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメタシンにより抑制されなかったことから、プロスタグランジン類の関与も否定された。

Table 2

Binding affinity for receptors that mediate vascular contraction and relaxation.

Receptor	Ki value (nM)
DHP receptor	0.16
ACh muscarinic receptor	> 1000
α_1 -Adrenoceptor	> 1000
α_2 -Adrenoceptor	> 1000
β -Adrenoceptor	> 1000
H ₁ Histamine receptor	> 1000
S ₁ 5HT receptor	> 1000
S ₂ 5HT receptor	> 1000
A ₁ adenosine receptor	> 1000
B ₂ bradykinin receptor	> 1000
AT ₁ Ang II receptor	> 1000
TXA ₂ receptor	> 1000
V ₁ vasopressin receptor	> 1000
ET _A endothelin receptor	> 1000

Mori (1996)

したがって、プラニジピンが NO 合成を増強するか NO の分解を抑制することにより組織中 NO 含有量を増加させる可能性が考えられた。実際、本章で行った試験では NO 合成阻害薬である 10^{-4} M の N^G-nitro-L-arginine により、内皮依存性弛緩反応は消失した。しかしながら、プラニジピンは内皮由来構成型 NO 合成酵素活性に対し増強作用を示さず、またムスカリン、ヒスタミン H₁、プラニジキニン B₂、バソプレシン V₁ などの NO 放出に関与するレセプターに対する親和性は低かった (Table 2). また、NO 感受性電極法および化学ルミネセンス法にて、大動脈リング標本中の NO 産生量の定量を試みたが、検出感度が足りず定量することができなかった。そこで、NO 測定の

かわりに、その下流のセカンドメッセンジャーである cGMP を定量したが、プラニジピンは、予想に反して、大動脈組織中におけるアセチルコリンに誘発された cGMP 含量の増加に影響を与えなかった。

次に、プラニジピンが cGMP の増加を伴わず内依存性弛緩反応を増強する可能性として、以下の仮説を立てた。1) プラニジピンは、収縮関連タンパクに対するカルシウム感受性を低下させる、2) プラニジピンは、細胞内収縮機構に対する cGMP の感受性を増強する、3) プラニジピンは、cGMP 非依存性の血管拡張作用を増強する。まず1)の仮説を検証するため、 α -トキシシンによる血管のスキンド標本を用い、カルシウム感受性について検討した。スキンド標本は、細胞膜の物質透過性を上昇させることにより、プラニジピンの細胞内タンパクに対する直接作用が検討できる標本である(Horiuti, 1988; Takeuchi *et al.*, 1996)。この標本では、外液のカルシウム濃度を上昇させると収縮が起こるが、収縮が安定したところでプラニジピンを処置しても収縮はほとんど影響を受けなかった。したがってプラニジピンは、収縮関連タンパクのカルシウム感受性を変える可能性はないものと考えられた。次に2)の検証を行うため、スキンド標本においてカルシウムで収縮させた状態で cGMP を作用させると弛緩がおきたが、この弛緩に対しプラニジピンは影響を与えなかった。したがって、プラニジピンの作用は、cGMP の弛緩反応の増強作用でもないことが示唆された。最後に、3)の可能性を検証するため、cGMP の合成酵素であるグアニル酸シクラーゼを完全に抑制すると考えられる用量のメチレンブルー存在下でアセチルコリンを添加すると、コントロールではほとんど弛緩が消失したが、プラニジピン存在下では小さいながら明らかな弛緩が認められた。これは、血管平滑筋にはグアニル酸シクラーゼ - cGMP 系を介さない NO による弛緩のメカニズムが存在し、それをプラニジピンが増強する可能性があることを支持するものである。プラニジピンによる内皮依存性弛緩反応増強作用は、メチレンブルー非存在下では、コントロール群と比較し $\text{PGF}_{2\alpha}$ による収縮の

約 20% (Fig. 5, 下左図) であるが、メチレンブルー存在下では約 7% (Fig. 10) であった。この矛盾は、メチレンブルーが、グアニル酸シクラーゼ阻害作用とともに、同じヘム酵素である NO 合成酵素も阻害することに起因するのかもしれない (Mayer *et al.*, 1993)。すなわち、NO 合成がメチレンブルー存在下では阻害され、プラニジピンの持つ NO による cGMP 非依存性弛緩反応の増強作用が制限された可能性が考えられる。

プラニジピンによる cGMP 非依存性 NO 誘発血管弛緩反応の増強をさらに確認する目的で、内皮を除去した血管標本において、NO 供与体であるニトログリセリンの作用を検討した。プラニジピンは、アセチルコリンの場合と同様に、ニトログリセリンによる血管弛緩反応を延長させ、さらに、メチレンブルー抵抗性の弛緩反応も増強した。一方、アムロジピンは、ニトログリセリンの作用にも影響を与えなかった。このニトログリセリンを用いた解析結果からも、血管平滑筋にはグアニル酸シクラーゼ - cGMP 系を介さない NO による弛緩のメカニズムが存在し、それをプラニジピンが増強する可能性が示唆された (Fig. 15)。

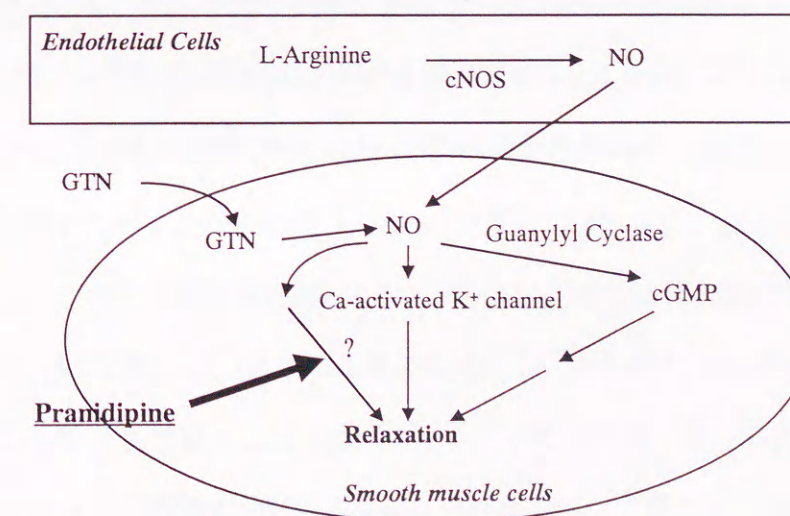


Fig. 15. Pramlidipine enhances cGMP-independent nitric oxide-induced relaxation.

cNOS; constitutive NO synthase, GTN; glyceryl trinitrate

近年, Takeuchi らは, ラット近位結腸に cGMP 非依存性の NO を介した弛緩メカニズムが存在することを報告した (Takeuchi *et al.*, 1996). さらに, ウサギ胸部大動脈標本において, NO は, 直接的にカルシウム活性化カリウムチャネルを開口させ, 膜の過分極を引き起こし弛緩を誘導することが報告されている (Bolotina *et al.*, 1994). これは, 血管組織にも cGMP 非依存性の NO を介した弛緩メカニズムが存在することを証明したものである. そこで, 本研究では, カルシウム活性化カリウムチャネル阻害剤であるイベリオトキシンおよびカリブドトキシンを用い, メチレンブルー抵抗性のニトログリセリンによる弛緩反応に対する作用を検討したところ, この弛緩反応は完全に消失した. しかし, プラニジピンは, この状態においても, 有意な弛緩反応を示した. 以上の結果から, ラット大動脈標本で認められた cGMP 非依存性の NO 誘発弛緩反応には, カルシウム活性化カリウムチャネルを介する反応が存在することが示唆されたが, プラニジピンはこの機序には作用しないものと推測される.

本研究により, プラニジピンは, cGMP 非依存性に NO を介した弛緩反応を増強させることが示唆された. cGMP を介さない機序として, NO によるカルシウム活性化カリウムチャネルを介する膜過分極が考えられたが, その可能性は否定された. したがって, 現時点でプラニジピンの作用は NO による未知の弛緩反応に作用しているとしか言えないが, プラニジピンの詳細な作用機序については今後さらに解析する必要がある.

第3章 麻酔下ラットにおけるプラニジピンの静脈 拡張作用

1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬は, 他のクラスのカルシウム拮抗薬と比較し, 陰性変力作用が弱く, 抵抗血管拡張作用の強い薬剤であると言われている (Taira, 1987). 実際, プラニジピンも, 麻酔下イヌ生体位標本において, 冠状動脈, 大腿動脈, 椎骨動脈, 腸間膜動脈など様々な動脈の血流量を増加させることが確認されている (Nakayama *et al.*, 1991). また 1,4-DHP は, 全身静脈トーンに影響を与えないことが報告されている (Ito & Hirakawa, 1984; Waite *et al.*, 1988). しかしながら, プラニジピンは第2章において, cGMP 非依存性に NO を介した弛緩反応を増強させることが示唆された. NO 供与体は, 動脈拡張作用と共に強い静脈拡張作用を有することから, プラニジピンも静脈拡張作用を有する可能性が考えられる. そこで本章では, 麻酔下ラットを用い静脈拡張作用の指標となる平均循環充満圧 (MCFP) に対するプラニジピンの作用について, 代表的な 1,4-DHP であるニフェジピンおよびアムロジピンと比較検討した. また, 陽性対照薬として, ニトログリセリンを用いた.

MCFP は, 心臓に送り込まれる血液を遮断し, 大動脈内の血液を大動脈圧と大静脈圧が等しくなるまで素早く送り出すことにより得られる, 単一の大循環系の充満圧である. すなわち, 動脈系と静脈系を併せた全身のコンプライアンスを表すことになる. しかしながら, 静脈のコンプライアンスは, 動脈のコンプライアンスよりもはるかに大きいいため, MCFP は主に静脈コンプライアンスを表す指標となる. そのコンプライ

アンス比（動脈 / 静脈）は、イヌにおいては 1/30 (Shoukas & Sagawa, 1973), SHR で 1/100 (Samar & Coleman, 1979), Wistar-Kyoto ラットで 1/75 (Samar & Coleman, 1979), Wistar 系ラットで 1/60 (Yamamoto *et al.*, 1980) と算出されている。

第1節 ラットにおける平均循環充満圧に対する作用

＜方法＞

1) 動物の手術

体重 270 – 350 g の雄性 Wistar 系ラットをウレタン (1.5 g/kg, i.p.) で麻酔した後、気管カニューレ (アトム多用途チューブ; 7 Fr) を気道に挿入し、自発呼吸下で実験に供した。右大腿静脈に薬液持続投与用カニューレ (PE-30) を、左大腿動脈に動脈圧測定用カニューレ (PE-50) を、さらに左大腿静脈に静脈圧測定用カニューレ (PE-30) を下大静脈腹部まで挿入した。また、全身循環停止用にバルーンカテーテル (Fogarty catheter, 3 Fr) を右頸静脈から右心房まで挿入した。

2) MCFP の測定

MCFP は、Yamamoto らの方法に準じ (Yamamoto *et al.*, 1980), 右心房内に挿入したバルーンに 0.2 ml の生理食塩水を注入し、全身循環を停止させることにより測定した (Fig. 16)。MCFP は、以下の式から算出した。

$$\text{MCFP} = \text{VPP} + 1/60 (\text{FAP} - \text{VPP})$$

VPP; venous plateau pressure

FAP; final arterial pressure

なお、VPP 値は、右心房に挿入したバルーンの膨張により静脈圧が速やかに上昇して平衡に達したところの値で、FAP 値は、その時の動脈圧である。動静脈圧は、カテーテルを圧トランスデューサー (MPU-0.5, NEC-San-ei) に接続することにより測定し、増幅アンプ (1206 B, NEC-San-ei) を介し熱ペンレコーダー (Recti-Horiz 8K, NEC-San-ei) 上に記録した。

3) 試験プロトコール

圧反射の影響を除外するため、0.135 mg/kg/min (0.5 ml/hr) のヘキサメトニウムの投与を開始し、さらにヘキサメトニウムにより低下した血圧を元のレベルに戻すため 2.0 $\mu\text{g/kg/min}$ (0.5 ml/hr) のノルエピネフリンを追加投与した。両薬物は、実験終了まで持続投与した。次に、血圧の安定したところで、動脈圧、心拍数および MCFP の薬物投与前値を測定した。10 分後、プラニジピン (10, 30 $\mu\text{g/kg}$)、ニフェジピン (30, 100 $\mu\text{g/kg}$)、アムロジピン (1000, 3000 $\mu\text{g/kg}$)、ニトログリセリン (30, 100 $\mu\text{g/kg}$) およびその溶媒のいずれかを、約 15 分間隔で低用量から静脈圧測定用カニューレを介し投与した。なお、薬物各用量投与後の全てのパラメーターは、降圧作用のピークにおいて測定した。各被験薬物の用量は、互いに同程度の降圧作用を示す 2 用量を設定した。

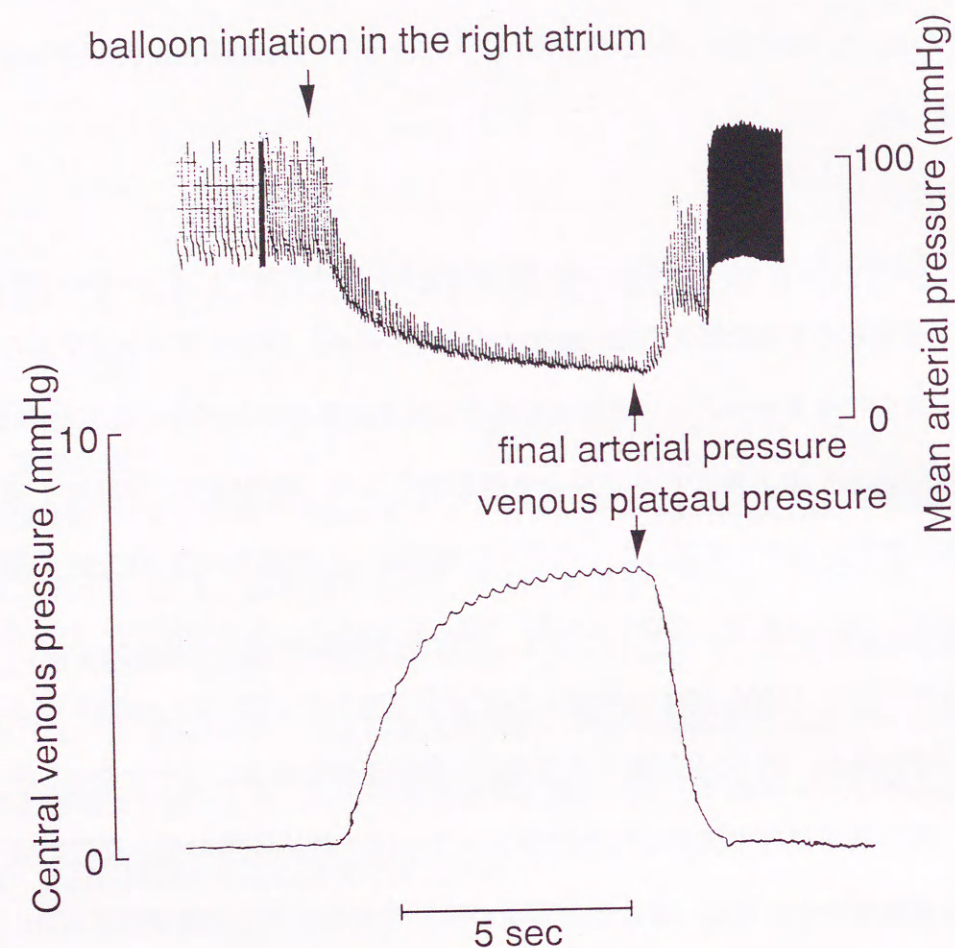


Fig. 16. Representative recordings of arterial and venous pressures during balloon inflation in the right atrium. After inflating the balloon to stop the circulation, mean arterial pressure (MAP) decreased and central venous pressure (CVP) increased simultaneously. CVP reached venous plateau pressure (VPP) about 5 sec after inflation.

<結果>

30 および 100 $\mu\text{g/kg}$ の用量のニトログリセリンは、溶媒投与群に比べ MCFP を用量依存的に有意に低下させた (Fig. 17) ことから、この実験系で薬物の静脈に対する作用を十分評価しうると考えた。そこで、プラニジピン、ニフェジピンおよびアムロジピンは、ニトログリセリンと同程度の降圧作用を示す用量を設定し、実験を行った。

Table 3 には、MCFP および平均血圧の被験薬物投与前値を示した。これらパラメーターには、動物群間において有意な差は認められなかった。また降圧の程度にも、4 薬物間で有意な差は認められなかった (Fig. 17, a)。この条件下で、プラニジピン (10, 30 $\mu\text{g/kg}$) は、溶媒投与群と比較し、MCFP を用量依存的に有意に低下させた。一方、ニフェジピン (30, 100 $\mu\text{g/kg}$) は MCFP を有意に低下させず、アムロジピン (1000, 3000 $\mu\text{g/kg}$) は、高用量でのみ有意に低下させた。被験薬物間で検定を行ったところ、高用量でのプラニジピンの MCFP 低下作用は、ニフェジピンおよびアムロジピンと比較し有意に大きかった (Fig. 17, b)。心拍数は、プラニジピン、ニフェジピンおよびアムロジピン投与群において、溶媒投与群と比較し、有意に低下した (データ省略)。

Table 3

Basal and control values of mean circulatory filling pressure (MCFP) and mean arterial pressure (MAP) in each group.

	MCFP (mmHg)	MAP (mmHg)
<i>Before hexamethonium + norepinephrine (basal)</i>		
Vehicle	6.2 ± 0.1	88 ± 3
Pranidipine	6.1 ± 0.2	79 ± 3
Nifedipine	5.9 ± 0.2	81 ± 3
Amlodipine	5.9 ± 0.3	79 ± 3
Nitroglycerin	6.2 ± 0.3	85 ± 6
<i>After hexamethonium + norepinephrine (control)</i>		
Vehicle	6.2 ± 0.2	86 ± 4
Pranidipine	6.5 ± 0.3	78 ± 3
Nifedipine	6.2 ± 0.4	81 ± 2
Amlodipine	6.4 ± 0.2	79 ± 3
Nitroglycerin	6.3 ± 0.4	84 ± 3

Values are expressed as means ± S.E. (n=7 per group). There were no significant differences in the control values of MCFP and MAP among the groups.

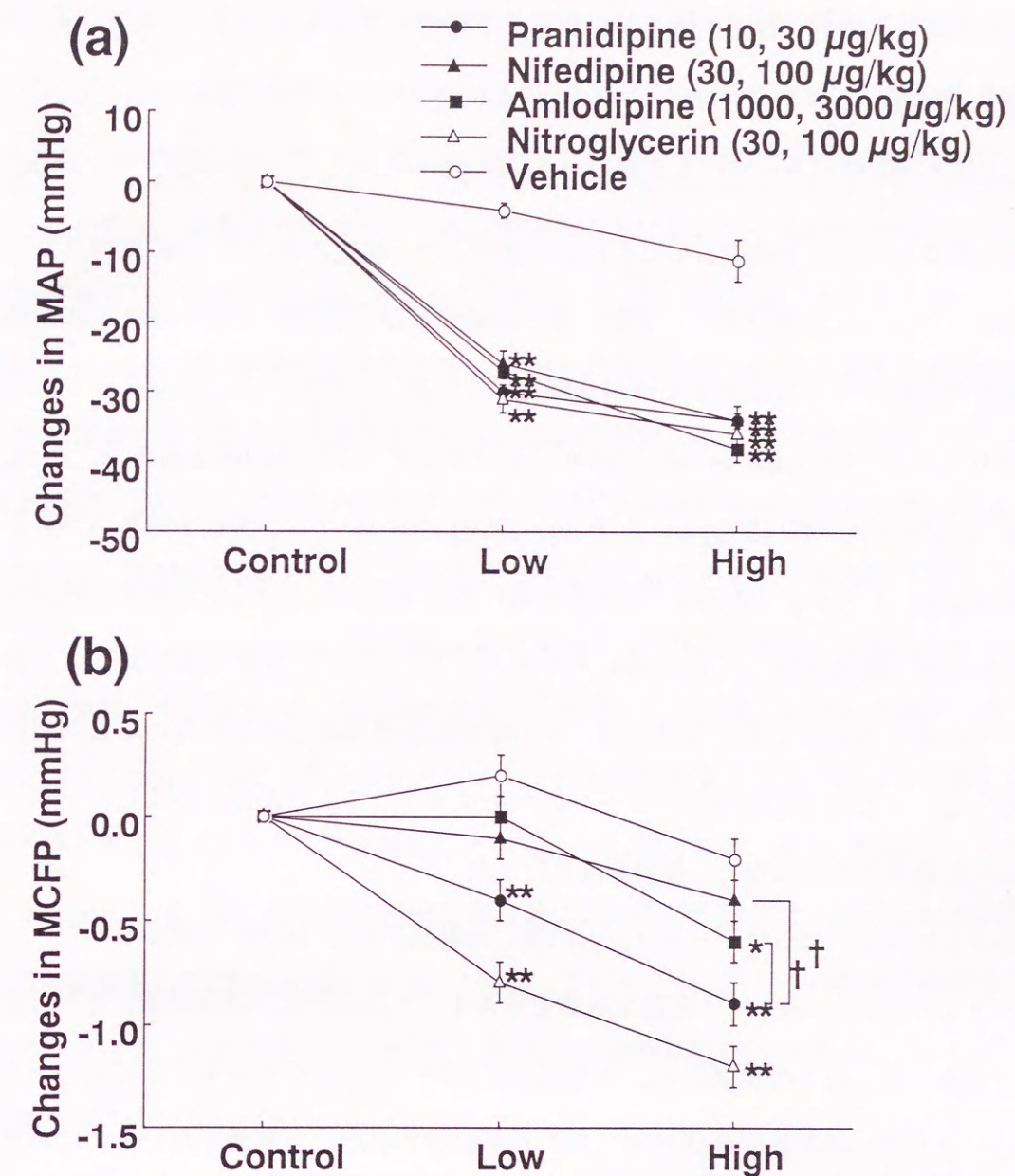


Fig. 17. Effects of pranidipine, nifedipine, amlodipine, nitroglycerin and the vehicle on MAP (a) and MCFP (b).

Values are expressed as changes from control values and means ± S.E. (n=7 per group). MAP; mean arterial pressure, MCFP; mean circulatory filling pressure, Low; lower dose of each compound, High; higher dose of each compound. *P < 0.05, **P < 0.01 compared with the vehicle-treated group. †P < 0.05 compared with the pranidipine-treated group.

第2節 考察

本章では、プラニジピンの MCFP に対する作用を、ニフェジピン、アムロジピンおよびニトログリセリンと比較することにより検討した。MCFP は、in vivo における全身の静脈トーンスの指標であり、実際、多くの研究者が、MCFP を用い様々な血管作動性物質の静脈トーンスに対する作用を検討している。その中、ニトロプルシド、ニトログリセリン (D'Oyley *et al.*, 1989), イソプレナリン (Abdelrahman & Pang, 1990), α 受容体拮抗薬 (D'Oyley & Pang, 1990), カルシトニン遺伝子関連ペプチド (Abdelrahman & Pang, 1992) などの静脈拡張作用が報告されている化合物は、あらかじめ自律神経活性を遮断しておくか、ノルエピネフリンなどの静脈収縮物質により静脈トーンスを上昇させておかなければ、その静脈拡張作用は認められないことが報告されている。そこで本試験でも、ラットにヘキサメサニウムおよびノルエピネフリンを静脈内持続投与した状態で、薬効評価を行った。

プラニジピンは、ニトログリセリンと同様に用量依存的に MCFP を減少させた。一方、ニフェジピンは MCFP に有意な影響を与えず、アムロジピンは高用量でのみ有意な減少を示した。以上の結果から、プラニジピンは、ニフェジピンやアムロジピンと比較し、より強い静脈拡張作用を有することが示唆された。本実験で用いられた用量のカルシウム拮抗薬は、同程度の降圧作用を示したことから、同程度のカルシウムチャンネルの拮抗作用を発現しているものと考えられる。したがって、プラニジピンによる静脈拡張作用は、カルシウムチャンネル拮抗作用以外のメカニズムが関与しているものと推測される。

1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬は、MCFP にほとんど影響を与えないという見解が以前に報告されている (Ito & Hirakawa, 1984; Waite *et al.*, 1988)。これらの知見は、in vitro 試験においても支持されており、ニフェジピンは、摘出大腿動脈標本において KCl

やノルエピネフリンによる収縮を抑制する用量では、摘出大腿静脈標本におけるノルエピネフリンの収縮を抑制しないと報告されている (Yamaura *et al.*, 1994)。しかし、1,4-DHP の中でも CD-832 は、生体内で切断され放出されるニトロ置換基を有しており、その結果、麻酔下ヘキサメトニウム処置ラットにおいて、MCFP を低下させることが報告されている (Shiramoto *et al.*, 1994)。プラニジピンは、そのようなニトロ置換基を持たないが、前章で述べたように cGMP 非依存的に NO による内皮依存性弛緩反応を増強させることが示唆されている。この作用は、本試験で用いたニフェジピンおよびアムロジピンでは認められず、プラニジピン特有の作用であると思われる。したがって、本試験で認められたプラニジピンによる MCFP の低下作用は、プラニジピンの持つ NO による内皮依存性弛緩反応を増強させる作用が関与した可能性が考えられる。実際、本試験で NO 供与体であるニトログリセリンは、MCFP を顕著に低下させている。Ohura らは、プラニジピンは、ブタ虚血再灌流モデルにおける左室拡張終期圧の上昇を低下させることを報告した (Ohura *et al.*, 1994)。また、Nishinaka らは、プラニジピンは、狭心症患者の運動負荷試験における肺動脈せつ入圧の上昇を抑制することを報告した (Nishinaka *et al.*, 1994)。これらプラニジピンの前負荷軽減作用を示す結果には、本章で確認されたプラニジピンの静脈拡張作用が寄与している可能性が考えられる。

カルシウム拮抗薬は、しばしば副作用として四肢の浮腫を生じさせる (Russell, 1988)。この副作用は、細動脈の拡張にもかかわらず細静脈が拡張しないため、毛細血管内圧が上昇する結果生じるとされている。本試験においても、ニフェジピンおよびアムロジピンは、静脈トーンスの指標である MCFP にはあまり影響を与えず、動脈トーンスを反映する血圧を顕著に低下させており、この結果は臨床において生じる浮腫の惹起を支持するものである。一方、プラニジピンは、血圧の低下と共に MCFP を低

下させていることから、臨床において浮腫を生じにくい薬剤となる可能性が考えられる。

以上本研究より、プラニジピンは、代表的な 1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬であるニフェジピンおよびアムロジピンと比較し、より強い静脈拡張作用を有することが示唆された。この作用は心疾患における前負荷軽減作用に貢献するものと期待される。

第4章 総括

本研究では、1,4-DHP 系カルシウム拮抗薬であるプラニジピンの薬理学的検討を行った。その結果、プラニジピンは、cGMP 非依存性に NO による血管平滑筋弛緩反応を増強すること、また強い静脈拡張作用を有するという既存のカルシウム拮抗薬になり特異な作用を有する知見が得られた。

1,4-DHP 誘導体は、光学異性体を有する化合物が多く、作用力価が両異性体で異なる化合物の他、幾つかの化合物においては2種の異性体がカルシウムチャネルの拮抗薬と作動薬という相反する作用を示す (Goldmann & Stoltefuss, 1991)。プラニジピンも同様に光学異性体を有するため、異性体間の薬理学的差異を、ラット摘出大動脈標本および麻酔下 SHR を用い検討した。両異性体は、ラット摘出大動脈標本において外因性カルシウムによる収縮を用量依存的に抑制した。その効果は、S(+)-体が R(-)-体と比較し、約 50 倍強かった。麻酔下 SHR において、S(+)-体は、3 – 30 $\mu\text{g/kg}$ (i.v.) の用量で用量依存的に降圧作用を示したが、R(-)-体は同用量において有意な降圧作用を示さなかった。以上の結果から、プラニジピンは両異性体共にカルシウム拮抗作用を有し、その作用には、主に S(+)-体が関与していることが示唆された。また、これら異性体のコンピュータによる安定構造計算予測を行うと、従来から提唱されている 1,4-DHP の構造活性相関と一致していた (第 1 章)。

プラニジピンは、既存のカルシウム拮抗薬であるニフェジピン、ジルチアゼムおよびベラパミルなど異なり、ラット摘出大動脈標本において、アセチルコリンなどに

よる内皮依存性弛緩反応を延長する。そこで、その詳細なメカニズムを解明するため種々の検討を行った。このプラニジピンの作用は、代表的な長時間作用型 1,4-DHP であるアムロジピンでも生じなかったことから、やはり 1,4-DHP 系薬物に共通の作用ではないと考えられた。またインドメタシンで影響されなかったことから、プロスタグランジン類の関与は否定された。次に NO の関与について検討するため、NO 合成阻害薬である N^G -nitro-L-arginine 存在下でアセチルコリンの反応を観察したところ、アセチルコリンによる弛緩はほとんど認められず、その条件下ではプラニジピンは何ら作用を発現しなかった。以上の結果から、プラニジピンの作用は NO による弛緩反応のカスケードに働いているものと考えられた。なお、セカンドメッセンジャーである cGMP の増加を経時的に調べたが、予想に反しプラニジピンの有無で差は認められなかった。cGMP の量に差がないにもかかわらず、弛緩作用に差がでる可能性として、収縮タンパクのカルシウム感受性や cGMP の弛緩に対するプラニジピンの直接作用が考えられた。そこで、それらプラニジピンの作用の有無を α -トキシン処置による血管のスキンド標本を用い検討したが、何ら影響は認められなかった。また、グアニル酸シクラーゼ阻害薬であるメチレンブルー存在下でアセチルコリンを添加してみると、コントロールではほとんど弛緩が消失したが、プラニジピン存在下では小さいが明らかな弛緩が認められた。さらに、内皮除去標本において、プラニジピンは NO の供与体であるニトログリセリンの弛緩作用の持続を延長し、さらにメチレンブルー処置下に残存するニトログリセリンの弛緩作用をも増強した。このメチレンブルー抵抗性のニトログリセリンによる弛緩反応は、カルシウム活性化カリウムチャネル阻害剤であるイベリオトキシンおよびカリブドトキシンによりほぼ完全に消失したが、プラニジピンは、この状態においても、有意な弛緩反応を示した。以上の結果から、血管平滑筋には、グアニル酸シクラーゼ - cGMP 系を介さない NO による弛緩のメカニズムが存在し、それをプラニジピンが増強する可能性が示唆された。また、この作用は、カ

ルシウム活性化カリウムチャネル由来の膜過分極反応に依存しないことが確認された (第 2 章)。このように、プラニジピンは、他のカルシウム拮抗薬とは異なり、NO による内皮依存性弛緩を増強することが示唆された。NO 供与体は、一般的に動脈拡張作用と共に強い静脈拡張作用を有することが知られている。したがって、プラニジピンは、他の 1,4-DHP 系薬物と比較し、より大きく静脈を拡張させる可能性が考えられる。そこで、麻酔下ラットにおいて、静脈拡張の指標となる MCFP に対するプラニジピンの作用を、ニフェジピンおよびアムロジピンと比較検討した。10 および 30 $\mu\text{g/kg}$ (i.v.) の用量のプラニジピンは、ニトログリセリンと同様に、用量依存的に MCFP を低下させた。その作用は、プラニジピンと同程度の降圧作用を有するニフェジピンおよびアムロジピンよりも強力であった。すなわちプラニジピンは、ニフェジピンおよびアムロジピンよりも強い静脈拡張作用を有する可能性が示唆された (第 3 章)。

本研究により、プラニジピンには光学異性体が存在するが、そのカルシウム拮抗作用には主に S(+)-体が関与することが確認された。この結果は、従来から提唱されている 1,4-DHP の構造活性相関と良く一致していた。また、プラニジピンは cGMP 非依存性に NO による血管平滑筋弛緩反応を増強するというユニークな作用を有することが示唆された。さらに、そのプロファイルから静脈系に対する作用を検討したところ、プラニジピンは、代表的な 1,4-DHP であるニフェジピンおよびアムロジピンと比較し、より強い静脈拡張作用を有することが示唆され、この作用は心疾患における前負荷軽減作用や副作用である末梢浮腫の軽減作用に貢献するものと期待される。

付記

薬物

プラニジピンおよびその光学異性体は、大塚製薬の徳島第二研究所あるいは徳島第二工場で合成されたものを使用した。その他本研究で用いた主な薬物は、アムロジピン (Amlodin®から抽出, Sumitomo), インドメタシン (Wako Pure Chemical), イベリオトキシン (Peptide Research Institute), カリブドトキシン (Latoxan Scorpion Farm), *Staphylococcus aureus* α -トキシン (Gibco Biological Research Laboratories), 100% dimethylformamide (DMF; Wako Pure Chemical), 100% dimethylsulfoxide (DMSO; Wako Pure Chemical), ニトログリセリン (Nihon-kayaku), ノルエピネフリン (Sankyo), ヘキサメトニウム (Wako Pure Chemical) である。その他使用した薬物は、Sigma や Dojin chemical などから購入した解析グレードの化合物である。

薬物調製

<第一章>

第一節

プラニジピンの光学異性体は、100% DMSO に溶解し、蒸留水で 50~30%にまで希釈したものを 100 μ l 添加した (DMSO のオーガンバス中濃度は 0.17~0.23%)。なお、溶媒コントロール群は、オーガンバス中濃度が 0.17~0.23% になるように DMSO を添加した。

第二節

プラニジピンおよびその光学異性体は、100% DMF と生理食塩水を等量混合した 50% DMF 溶液に 0.5 mg/ml で溶解し、さらに 50% DMF 溶液で 0.05 mg/ml まで希釈した。薬物の投与量は、1, 3 μ g/kg (0.05 mg/ml の濃度のものを 20 および 40 μ l/kg の割合) および 10, 30 μ g/kg (0.5 mg/ml の濃度のものを 14 および 40 μ l/kg の割合) を静脈内に累積的に投与した。なお、溶媒投与群には、50% DMF を投与した。

<第二章>

プラニジピンおよびアムロジピンは、まず 100% DMSO で溶解させた後、2 μ M の 75% DMSO 溶液を作製した (オーガンバス中の DMSO の最終濃度は、約 0.13%)。インドメタシンは、エタノール中に 100 mM の濃度で溶解させ、オーガンバス中のエタノールの最終濃度が 0.1%となるようにした。

＜第三章＞

プラニジピンは、100% DMF に溶解し、生理食塩水で希釈した後、0.2 mg/ml (40% DMF) および 0.5 mg/kg (45% DMF) の濃度の溶液を調製し、それぞれ 50 および 60 μ l/kg の割合で静脈内投与した。ニフェジピンは、100% DMF に溶解し、生理食塩水で希釈した後、0.6 mg/ml (40% DMF) および 1.5 mg/kg (45% DMF) の濃度の溶液を調製し、それぞれ 50 および 66.6 μ l/kg の割合で静脈内投与した。アムロジピンは、100% DMF に溶解し、生理食塩水で希釈した後、20 mg/ml (40% DMF) および 50 mg/kg (45% DMF) の濃度の溶液を調製し、それぞれ 50 および 60 μ l/kg の割合で静脈内投与した。ニトログリセリンは、0.5 mg/ml の濃度の溶液を 60 および 200 μ l/kg の割合で静脈内投与した。ノルエピネフリンは、体重 (kg) 当たり 0.24 mg/ml の濃度のものを、ヘキサメトニウムは体重当たり 16.2 mg/ml の濃度のものを、ともに 0.5 ml/hr の一定速度で静脈内持続投与した。

データ解析

実験結果は、すべて平均値 \pm 標準誤差で表示した。溶媒投与群と各薬物投与群の比較には、繰り返し測定に基づく分散分析（プロファイル解析）を用いた。各ポイント毎の比較は、溶媒投与群との間で Dunnett 検定（両側）もしくは Student-t 検定（両側）を行った。これらの検定では、危険率が 5% 未満の場合を有意差有りとした。なお、これらの解析には、統計パッケージである SAS (Statistical Analysis System) を用いた。

謝辞

本論文の作成に際し、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師、東北大学大学院薬学研究科機能解析薬学講座薬理学分野教授 佐藤進先生に謹んで感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、幾多の有益な御助言、御指導を賜りました東北大学大学院薬学研究科機能解析薬学講座機能分子生化学分野教授 大内和雄先生、同生体情報薬学講座薬物送達学分野教授 寺崎哲也先生、同生体情報薬学講座細胞情報薬学分野教授 中畑則道先生、同機能解析薬学講座薬理学分野助教授 比佐博彰先生に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、多大なる御指導と御協力を賜りました大阪府立大学農学部獣医薬理学講座教授 畑文明先生、同助教授 竹内正吉先生、徳島大学大学院栄養学研究科特殊栄養学講座教授 中屋豊先生、徳島大学地域共同センター助教授 佐竹弘先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始過分の御便宜と有益な御助言を賜りました大塚製薬株式会社 森豊樹博士に心より感謝いたします。

また、本研究に際し御協力を賜りました木戸勝博士、都田悟朗博士、戸出清孝博士、大浦真研究員、藤木浩之研究員、折戸謙介博士、及び旧新薬第二研究所の方々に深く感謝いたします。

引用文献

- Abdelrahman, A. & Pang, C.C. (1992). Calcitonin gene-related peptide is a venous dilator in conscious rats [published erratum appears in *Eur J Pharmacol* 1993 Jan 19;230(3):388]. *Eur J Pharmacol*, **217**, 185-189.
- Abdelrahman, A. & Pang, C.C. (1990). Differential venous effects of isoprenaline in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, **190**, 321-327.
- Arunlakshana, O. & Schild, H.O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonist. *Br J Chem Pharmacol*, **14**, 48-58.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J. & Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**, 850-853.
- Broadhurst, P., Brigden, G., Hittel, N., Lahiri, A. & Raftery, E.B. (1991). Prolonged hypotensive effect of OPC-13340: a new, once-daily calcium channel blocking drug. *Eur Heart J*, **12**, 434-438.
- Cruickshank, J.M., Thorp, J.M. & Zacharias, F.J. (1987). Benefits and potential harm of lowering high blood pressure. *Lancet*, **1**, 581-584.
- D'Oyley, H.M. & Pang, C.C. (1990). Effects of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor antagonists on venous tone in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, **182**, 283-290.
- D'Oyley, H.M., Tabrizchi, R. & Pang, C.C. (1989). Effects of vasodilator drugs on venous tone in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, **162**, 337-344.
- Franckowiak, G., Bechem, M., Schramm, M. & Thomas, G. (1985). The optical isomers of the 1,4-dihydropyridine BAY K 8644 show opposite effects on Ca channels. *Eur J Pharmacol*, **114**, 223-226.
- Furberg, C.D., Psaty, B.M. & Meyer, J.V. (1995). Nifedipine. Dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation*, **92**, 1326-1331.
- Gjorstrup, P., Harding, H., Isaksson, R. & Westerlund, C. (1986). The enantiomers of the dihydropyridine derivative H 160/51 show opposite effects of stimulation and inhibition. *Eur J Pharmacol*, **122**, 357-361.
- Goldmann, S. & Stoltefuss, J. (1991). 1,4-Dihydropyridines: Effects of chirality and conformation on the calcium antagonist and calcium agonist activities. *Angew Chem Int Ed Engl*, **30**, 1559-1578.
- Harafuji, H. & Ogawa, Y. (1980). Re-examination of the apparent binding constant of ethylene glycol bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid with calcium around neutral pH. *J Biochem (Tokyo)*, **87**, 1305-1312.
- Hering, S., Berjukow, S., Aczel, S. & Timin, E.N. (1998). Ca²⁺ channel block and inactivation: common molecular determinants. *Trends Pharmacol Sci*, **19**, 439-443.
- Hockerman, G.H., Peterson, B.Z., Johnson, B.D. & Catterall, W.A. (1997). Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **37**, 361-396.
- Hoffman, H.J. & Cimiraglia, R. (1988). Conformation of 1,4-dihydropyridine - planar or boat-like? *FEBS Lett*, **241**, 38-40.
- Horiuti, K. (1988). Mechanism of contracture on cooling of caffeine-treated frog skeletal muscle fibres. *J Physiol (Lond)*, **398**, 131-148.
- Ito, H. & Hirakawa, S. (1984). Effects of vasodilators on the systemic capacitance vessels, a study with the measurement of the mean circulatory pressure in dogs. *Jpn Circ J*, **48**, 388-404.

- Mayer, B., Brunner, F. & Schmidt, K. (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol*, **45**, 367-374.
- Miyakoda, G., Nakayama, N., Matsui, K. & Yabuuchi, Y. (1995). Mechanisms of the potent and long-lasting antihypertensive action of the new calcium channel blocker pranidipine. Evidence for strong affinity to the calcium channels or membranes. *Arzneimittelforschung*, **45**, 471-475.
- Mori, T. (1996). プラニジピンの内皮依存性弛緩延長作用. *Ther Res*, **17**, 4476-4481.
- Mori, T., Nakayama, N., Ohura, M., Ikezono, K., Kinoshita, S., Kamata, M., Hosokawa, T., Yamashita, S. & Yabuuchi, Y. (1993). Cardiovascular effects of OPC-13340, a potent, long-acting 1,4-dihydropyridine calcium channel blocker, in dogs. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **321**, 41-56.
- Nakaya, H., Hattori, Y., Tohse, N. & Kanno, M. (1986). Voltage-dependent effects of YC-170, a dihydropyridine calcium channel modulator, in cardiovascular tissues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **333**, 421-430.
- Nakayama, N., Ikezono, K., Fujio, N., Sasabe, H., Kitaura, K., Tamada, S., Shirafuji, T. & Yabuuchi, Y. (1991). OPC-13340, a new potent long-acting dihydropyridine calcium antagonist. *Cardiovasc. Drug Rev*, **9**, 147-157.
- Nakayama, N., Ikezono, K., Mori, T., Yamashita, S., Nakayama, S., Tanaka, Y., Hosokawa, T., Minami, Y., Masutani, K., Yamamura, Y. & et al. (1990). Antihypertensive activity of OPC-13340, a new potent and long-acting dihydropyridine calcium antagonist, in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, **15**, 836-844.
- Nakayama, N., Ikezono, K., Ohura, M. & Yabuuchi, Y. (1993). Effects of the new long-acting dihydropyridine calcium antagonist pranidipine on the endothelium-dependent relaxation in isolated rat aorta in vitro. *Arzneimittelforschung*, **43**, 1266-1270.

- Nilius, B., Viana, F. & Droogmans, G. (1997). Ion channels in vascular endothelium. *Annu Rev Physiol*, **59**, 145-170.
- Nishinaka, Y., Yokota, M., Watanabe, M., Sobue, T., Iwase, M., Ukai, M., Ando, A., Nagata, K. & Saito, H. (1994). Hemodynamic effects of the calcium channel blocker pranidipine on exercise-induced angina. *Int J Clin Pharmacol Ther*, **32**, 542-549.
- Ohura, M., Mori, T., Watanabe, K., Ikezono, K., Nakayama, N., Tominaga, M. & Yabuuchi, Y. (1994). Effects of pranidipine (OPC-13340), a novel 1,4-dihydropyridine derivative Ca-antagonist, on isolated porcine coronary contraction and acute myocardial ischemia in the pig. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **103**, 101-109.
- Ohura, M., Orito, K., Miyakoda, G. & Mori, T. (1997). The selective vascular and negative chronotropic effects versus negative inotropic effects of pranidipine, a new 1,4-dihydropyridine calcium channel blocker, in isolated rat preparations. *Jpn J Pharmacol*, **73**, 70.
- Packer, M., O'Connor, C.M., Ghali, J.K., Pressler, M.L., Carson, P.E., Belkin, R.N., Miller, A.B., Neuberger, G.W., Frid, D., Wertheimer, J.H., Cropp, A.B. & DeMets, D.L. (1996). Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation Study Group. *N Engl J Med*, **335**, 1107-1114.
- Pahor, M., Guralnik, J.M., Furberg, C.D., Carbonin, P. & Havlik, R. (1996). Risk of gastrointestinal haemorrhage with calcium antagonists in hypertensive persons over 67 years old. *Lancet*, **347**, 1061-1065.
- Psaty, B.M., Heckbert, S.R., Koepsell, T.D., Siscovick, D.S., Raghunathan, T.E., Weiss, N.S., Rosendaal, F.R., Lemaitre, R.N., Smith, N.L., Wahl, P.W., Pagano, P.J. & Cohen, R.A. (1995). The risk of myocardial infarction associated with antihypertensive drug

therapies. *JAMA*, **274**, 620-625.

Rampe, D. & Kane, J.M. (1994). Activators of voltage-dependent L-type calcium channels.

Drug Dev Res, **33**, 344-363.

Rosenthal, J., Hittel, N. & Stumpe, K.O. (1996). Pranidipine, a novel calcium antagonist, once

daily, for the treatment of hypertension: a multicenter, double-blind, placebo-

controlled dose-finding study. *Cardiovasc Drugs Ther*, **10**, 59-66.

Russell, R.P. (1988). Side effects of calcium channel blockers. *Hypertension*, **11**, II42-44.

Samar, R.E. & Coleman, T.G. (1979). Mean circulatory pressure and vascular compliances in

the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*, **237**, H584-589.

Shiramoto, M., Imaizumi, T., Endo, T., Tagawa, T., Kubo, T., Tokunaga, S., Ando, S. &

Takeshita, A. (1994). Effects of a novel dihydropyridine calcium antagonist on

venous capacitance in Wistar-Kyoto rats. *Drugs Exp Clin Res*, **20**, 61-68.

Shoukas, A.A. & Sagawa, K. (1973). Control of total systemic vascular capacity by the

carotid sinus baroreceptor reflex. *Circ Res*, **33**, 22-33.

Staessen, J.A., Fagard, R., Thijs, L., Celis, H., Arabidze, G.G., Birkenhager, W.H., Bulpitt, C.J.,

de Leeuw, P.W., Dollery, C.T., Fletcher, A.E., Forette, F., Leonetti, G., Nachev, C.,

O'Brien, E.T., Rosenfeld, J., Rodicio, J.L., Tuomilehto, J. & Zanchetti, A. (1997).

Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older

patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe

(Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet*, **350**, 757-764.

Stewart, J.J.P. (1990). A semiempirical molecular orbital program. *J Comput-Aided Mol Des*,

4, 1-45.

Striessnig, J., Grabner, M., Mitterdorfer, J., Hering, S., Sinnegger, M.J. & Glossmann, H. (1998).

Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci*, **19**, 108-

115.

Taira, N. (1987). Differences in cardiovascular profile among calcium antagonists. *Am J*

Cardiol, **59**, 24B-29B.

Takeuchi, T., Kishi, M., Ishii, T., Nishio, H. & Hata, F. (1996). Nitric oxide-mediated

relaxation without concomitant changes in cyclic GMP content of rat proximal colon.

Br J Pharmacol, **117**, 1204-1208.

Tominaga, M., Tsuchihashi, T., Kinoshita, H., Kobayashi, K., Ohya, Y., Abe, I., Takata, Y. &

Fujishima, M. (1995). Ambulatory blood pressure monitoring in elderly

hypertensives treated with the new calcium antagonist, pranidipine (OPC-13340). *Int*

J Clin Pharmacol Ther, **33**, 277-280.

Van Rossum, J.M. (1963). Cumulative dose-response curves. *Arch Inst Pharmacodyn Ther*,

143, 299-330.

Waite, R.P., Pang, C.C. & Walker, M.J. (1988). Effects of calcium antagonists on mean

circulatory filling pressure in the conscious rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, **12**, 499-

504.

Williams, J.S., Grupp, I.L., Grupp, G., Vaghy, P.L., Dumont, L., Schwartz, A., Yatani, A.,

Hamilton, S. & Brown, A.M. (1985). Profile of the oppositely acting enantiomers of

the dihydropyridine 202-791 in cardiac preparations: receptor binding,

electrophysiological, and pharmacological studies. *Biochem Biophys Res Commun*,

131, 13-21.

Yamamoto, J., Trippodo, N.C., Ishise, S. & Frohlich, E.D. (1980). Total vascular pressure-

volume relationship in the conscious rat. *Am J Physiol*, **238**, H823-828.

Yamaura, H., Miyata, N., Takahashi, K., Tsuchida, K. & Otomo, S. (1994). Effects of CD-832,

a dihydropyridine derivative with a nitrate ester moiety on rabbit femoral artery and

vein. *Eur J Pharmacol*, 260, 269-272.

